

鱼腥藻 PCC7120 外膜的纯化和外膜蛋白的鉴定

董妍玲^{1,2} 徐旭东¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

PURIFICATION OF THE OUTER MEMBRANE AND IDENTIFICATION OF OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM ANABAENA SP. PCC7120

DONG Yan-Ling^{1,2} and XU Xu-Dong¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

关键词: 鱼腥藻; 外膜; 纯化; 蛋白

Key words: *Anabaena* sp.; Outer membrane; Purification; Protein

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0994-04

鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) PCC7120 是一种丝状固氮蓝藻, 在缺氮诱导条件下, 沿着丝体约每隔 10 个营养细胞分化出一个固氮细胞即异形胞, 在细胞分化中伴随着复杂的基因表达和调控, 成为一维原核生物体细胞分化及图式形成研究的模式^[1]。鱼腥藻和其他蓝藻的外膜是吸收营养物质的第一道屏障, 在鱼腥藻中还可能直接影响异形胞包被的形成, 对鱼腥藻等蓝藻的外膜蛋白的研究对于揭示高等植物叶绿体的进化过程也十分有意义。

鱼腥藻 PCC7120 外膜的纯化和外膜蛋白的鉴定是进行外膜蛋白功能研究的前提。杨劭等^[2]尝试用蔗糖梯度对鱼腥藻 7120 的细胞壁进行分离, 结果各种梯度均未能一次获得纯的细胞壁。Moslavac, *et al.*^[3]在不连续的蔗糖密度梯度中添加毛地黄苷, 获得了外膜组分, 但是在后续的外膜蛋白鉴定工作中, 仍存在少量质膜和类囊体膜来源的蛋白污染。其研究中采用液相色谱结合质谱的方法进行外膜蛋白的鉴定, 而没有进行双向凝胶电泳 (2-DE), 无法获得蛋白是否以二聚体形式存在、是否被磷酸化修饰等信息。本研究采用双相法结合不连续蔗糖密度梯度超离心的方法对鱼腥藻 PCC7120 的外膜进行了分离和纯化, 对外膜蛋白通过 2-DE 和质谱进行了鉴定, 以利于对外膜蛋白功能的深入研究。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养条件 鱼腥藻 PCC7120 来源于水生所藻种库 (FACHB), 以 BG-11 培养基在 28—30 °C 条件下光照 (50—70 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), 摇动或通气培养。

1.2 外膜的分离 以 2 L 三角瓶中通气培养鱼腥藻 PCC7120 至对数期, 离心收集后于液氮中速冻, 用于分离外膜。外膜的分离主要参照用于分离集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 的方法^[4, 5], 有所修改。双相系统第一次采用 6.6% 的体系, 组成为 6.6% (w/w) Dextran 500、6.6% (w/w) PEG3350、0.25 mol/L 蔗糖、2 mL 样品、5 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8), 得到的初级分离物用于 7.2% 的双相分离系统, 收集的上层液体主要以红色的外膜为主。进一步以不连续的蔗糖密度梯度进行纯化, 各梯度的组成为 (w/v): 2 mL 60%、3 mL (样品) 50%、3 mL 40%、2 mL 30% 和 2 mL 10% 蔗糖, 33000 r/min 离心 4 h, 收集 50%—60% 的分离相进行检测。上述操作均在 4 °C 进行, 溶液中加入 PMSF 以防止蛋白降解。

1.3 外膜的光谱扫描 将分离得到的外膜重悬于磷酸钾缓冲液中, 取 10 mL 以 Shimadzu UV-2450 分光光度计进行光谱扫描, 波长范围为 300—800 nm。

1.4 双向凝胶电泳 (2-DE)、SDS-PAGE、Western blot 采用 pH 范围 4—7, 13 cm 长的预制胶条进行第一向等电聚焦。

收稿日期: 2008-11-14; 修订日期: 2009-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 30570022 资助

作者简介: 董妍玲 (1977—), 女, 山东德州人; 博士研究生; 主要从事藻类遗传学研究。E-mail: shoongyanling@163.com

通讯作者: 徐旭东, E-mail: xux@ihb.ac.cn

聚焦条件为:50 V聚焦 12h(水化);200 V聚焦 1h;500 V聚焦 1h;1000 V聚焦 1h;2000 V聚焦 1h;5000 V聚焦 10 h。第二向电泳采用 12%的 SDS-PAGE电泳。凝胶采用考马斯亮蓝染色,用凝胶成像系统对染色后的 2-DE胶进行摄像和分析。SDS-PAGE和 Western blot按标准方法进行^[6]。抗体由本实验室制备获得。

1.5 蛋白点的测定及分析 以基质辅助-飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)进行的蛋白鉴定,委托北京大学医学部和上海基康生物技术有限公司完成。各基因的核苷酸序列及蛋白的氨基酸序列来自日本 Kazusa DNA 研究所 Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>),用 Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质的信号肽,用 TMHMM 2.0.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白的跨膜结构域。

2 结果与讨论

2.1 外膜的分离纯化

本研究中采用双相法结合不连续蔗糖密度梯度的方法对鱼腥藻 7120的外膜进行分离,以获得无其他膜污染的外膜组分。经光谱扫描检测发现,只经双相法分离而没有经蔗糖密度梯度超离心分离的外膜存在叶绿素 *a* 的吸收峰(440 nm和 680 nm),表明有微量类囊体膜的污染;而进一步经过蔗糖密度梯度处理后,外膜上叶绿素 *a* 的吸收峰几乎消失,

与总膜的吸收光谱也有明显的不同:在 487 nm 处有类胡萝卜素的吸收峰,在 457 nm 和 520 nm 处有两个肩峰(图 1)。分别用外膜、质膜和类囊体膜标志性蛋白 Toc75、NrtA 和 CP47 的抗体检测总膜和外膜,结果表明,经过双相法结合蔗糖密度梯度处理后的外膜上没有明显的质膜及类囊体膜蛋白带,证明纯化的外膜没有其他膜的污染(图 2 A、B)。

在实验中使用的两种高分子聚合物(PEG 3350和 Dextran 500)的浓度及蔗糖密度的梯度组成均与集胞藻 6803外膜的分离方法不同,说明不同蓝藻之间膜组分存在差异。

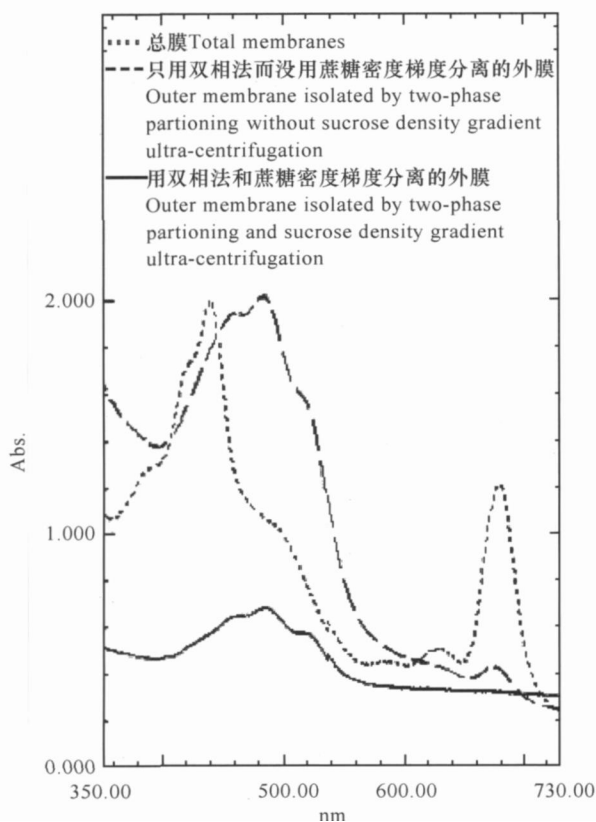


图 1 鱼腥藻 PCC7120外膜和总膜的光谱扫描图

Fig. 1 The absorption spectra of outer membrane and total membranes of *Anabaena* sp. PCC7120

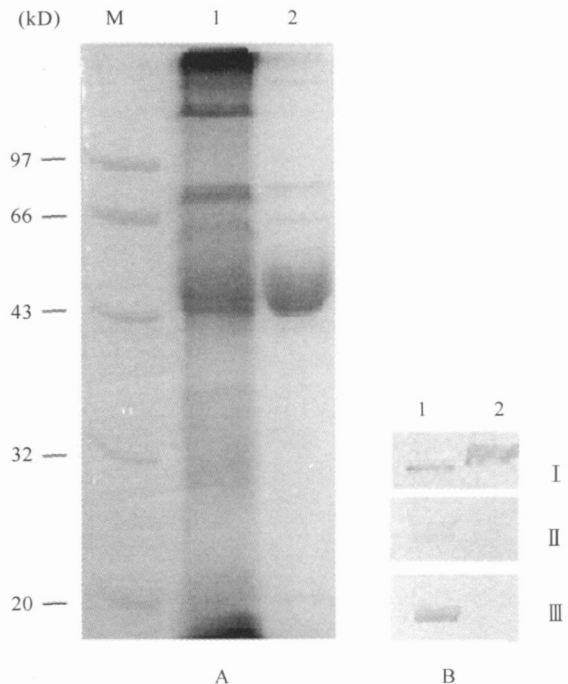


图 2 以 SDS-PAGE (A) 及 Western-blot (B) 检测鱼腥藻外膜的纯度
Fig. 2 Tests of purity of the outer membrane preparation from *Anabaena* sp. PCC 7120 with SDS-PAGE (A) and western-blot (B)

M. Marker; 1. 总膜; 2. 经双相和蔗糖梯度法分离的外膜; . 外膜蛋白 Toc75; . 质膜蛋白 NrtA; . 类囊体膜蛋白 CP47
M. Marker; 1. Total membrane proteins; 2. Outer membrane proteins isolated by two-phase partitioning and sucrose density gradient ultra-centrifugation; . outer membrane protein Toc75; . plasma membrane protein NrtA; . thylakoid membrane protein CP47

2.2 外膜蛋白的鉴定和基本特性

本研究中用 pH4—7的预制胶条进行双向凝胶电泳来分离鱼腥藻 PCC7120的外膜蛋白,并利用质谱鉴定部分表达量比较大的蛋白点,共鉴定了 11个蛋白点,分别对应 8个蛋白(图 3,表 1)。有 3个蛋白(A1h2269、A1h2887、A1h3983)有 2个蛋白点。这说明 3个蛋白经修饰存在等电点不同的形式。

8种蛋白的基本信息(表 1),用 Signal P 3.0和 TMHMM 2.0.1来预测蛋白质的信号肽和跨膜结构域。已鉴定蛋白的前体都含有纯化的信号肽序列,并且至少含有一个跨膜结构域,大多数的信号肽有约 30个氨基酸残基。

以上 8 种蛋白中有 2 个蛋白 (Alr2153、Alr2581) 与铁离子的转运有关,对此类蛋白的研究有助于揭示蓝藻对外界铁离子浓度变化的应答情况;有 2 个蛋白 (Alr3983、Alr4550) 含有 SLH (surface layers homology) 保守结构域。这类蛋白 (称 S-layers 蛋白) 在许多细菌中都存在,形成的表层结构包围在细胞壁的表面^[8]。在集胞藻 PCC6803、PCC6301 和 PCC7942 中也发现具有 SLH 结构域的蛋白质,但功能并不清楚^[8, 9]。细菌中的 S-layers 蛋白可以应用于纳米生物技术方面及通过重组 DNA 技术来展示外源多肽方面^[10, 11]。外膜中还有 1 个蛋白 (Alr2269) 与叶绿体的一个外膜蛋白类似,对这个蛋白的研究有助于揭示蓝藻细胞与高等植物叶绿体进化的亲缘关系;还有 2 个蛋白 (Alr4499、Alr2887) 功能不清。对这两个蛋白的编码基因分别进行敲除,对获得的突变株表型进行研究,将可能获得其功能的线索。限于考马斯亮蓝染色的灵敏度,而且一些蛋白需要特异条件诱导表达,一些外膜蛋白未能在本研究结果中观察到。但本文结果显示,采用双相法结合不连续蔗糖密度梯度超离心的方法能够获得高纯度的鱼腥藻外膜,借助串联质谱可以快速鉴定外膜蛋白,从而为外膜功能的研究提供技术上的支持。

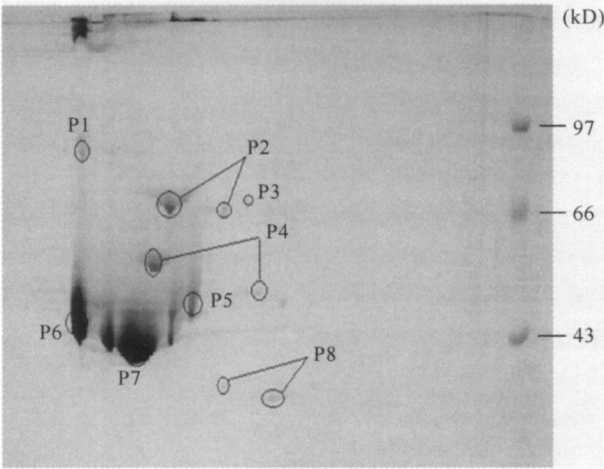


图 3 鱼腥藻 PCC7120 外膜蛋白的双向凝胶电泳图

Fig. 3 The 2-D gel electrophoretogram of outer membrane proteins from *Anabaena* sp. PCC 7120

IEF, pH 4—7; SDS-PAGE, 12%; 采用考马斯亮蓝染色; P1—8, 外膜蛋白 (表 1)

IEF, pH 4—7; SDS-PAGE, 12%; stained with coomassie brilliant blue; P1—8, outer membrane proteins (Tab. 1)

表 1 经 2-D 电泳分离的鱼腥藻外膜蛋白的鉴定

Tab. 1 Identification of *Anabaena* outer membrane proteins resolved by 2-D electrophoresis

Spot No.	ORF	Gene product	Mowse score	Masses matched	Sequence Co (v %)	MW (kD) / pI	Signal P 3. 0	Position of transmembrane helices
P1	alr2153	Outer membrane heme receptor	163	20/45 (44%)	22	89. 5 / 4. 8	VFA-AE (23)	6—22
P2	alr2269	Chloroplast outer membrane protein homolog	256	20/30 (66%)	19	89. 6 / 5. 0	ANA-QT (18)	1—18 471—487
P3	alr2581	Similar to ferric aerobactin receptor	110	18/42 (43%)	25	96. 4 / 4. 7	AVA-ET (34)	14—34
P4	alr2887	Hypothetical protein	262	22/38 (57%)	31	80. 8 / 6. 3	VW-SL I (36)	24—40 608—632
P5	alr4499	Hypothetical protein	271	25/36 (69%)	35	58. 5 / 5. 0	VWA-AP (26)	8—29 324—352 423—441
P6	alr0834	Porin	221	22/34 (65%)	30	54. 4 / 4. 6	AW-SLP (18)	1—17 227—249
P7	alr4550	S-layer protein	340	18/23 (78%)	42	60. 5 / 4. 8	VAA-EP (25)	8—29 346—365
P8	alr3983	Similar to S-layer protein	230	12/16 (75%)	43. 8	42. 35 / 5. 4	SFA-QT (21)	2—22 329—348 351—373

参考文献:

[1] Xu X, Elhai J, Wolk C P. Transcriptional and developmental responses by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen [A]. In: T

Herreno & E Flore (Eds), The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution [M]. Norwich, UK: Horizon Scientific Press 2008, 383—422

[2] Yang S, Wang Y Q, Li S H. Isolation and characterization of the cytoplasmic, thylakoid membranes and cell walls of *Anabaena* 7120

- [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1994, **25**: 357—361
[杨劭,王业勤,黎尚豪. 鱼腥藻 7120 质膜、类囊体膜和细胞壁
的分离和特性分析. 海洋与湖泊, 1994, **25**: 357—361]
- [3] Moslavac S, Bredemeier R, Mirus O, *et al* Proteomic analysis of
the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC7120 [J]. *Journal of Proteome Research*, 2005, **4**: 1330—1338
- [4] Norling B, Zakh E, Andersson B, *et al* 2D-isolation of pure
plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *FEBS Letters*, 1998, **436**: 181—
192
- [5] Huang F, Fulda S, Hagemann M, *et al* Proteomic screening of
salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis*
sp. Strain PCC6803 [J]. *Proteomics*, 2006, **6**: 910—920
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a la-
boratory manual, 2nd edition [C]. New York: Cold Spring Har-
bor Laboratory Press 1989, 880—898
- [7] Sää M, Sleytr U B. S-layer proteins [J]. *Journal of Bacteriolo-
gy*, 2000, **182**: 859—868
- [8] Engelhardt H, Peters J. Structural research on surface layers: a
focus on stability, surface layer homology domains, and surface
layer-cell wall interactions [J]. *Journal of Structural Biology*,
1998, **124**: 276—302
- [9] Šnarda J, Šnajs D. S-layers on cell walls of cyanobacteria [J].
Micron, 2002, **33**: 257—277
- [10] Moll D, Huber C, Schlegel B, *et al* S-layer-streptavidin fusion
proteins as template for nanopatterned molecular arrays [J]. *Pro-
ceedings of the National Academy of Sciences of the United States*,
2002, **99**: 14646—14651
- [11] Wang L, Sun M, Yu Z. Capacity of *Bacillus thuringiensis* S-layer
protein displaying polyhistidine peptides on the cell surface [J].
Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, **119**: 1331—
1343

《水生生物学报》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

主 编 Chief Editor 桂建芳 GUI Jian-Fang

副主编 Associate Editor 解绶启 XIE Shou-Qi

委 员 Members (以姓氏拼音为序)

蔡庆华 CAI Qing-Hua

陈家宽 CHEN Jia-Kuan

高坤山 GAO Kun-Shan

胡征宇 HU Zheng-Yu

林浩然 LIN Hao-Ran

麦康森 MAI Kang-Sen

沈韞芬 SHEN Yun-Fen

王 丁 WANG Ding

相建海 XIANG Jian-Hai

谢小军 XIE Xiao-Jun

徐旭东 XU Xu-Dong

余其兴 YU Qi-Xing

朱作言 ZHU Zuo-Yan

曹文宣 CAO Wen-Xuan

陈宜瑜 CHEN Yi-Yu

何舜平 HE Shun-Ping

李文鑫 LI Wen-Xin

刘建康 LIU Jian-Kang

聂 品 NIE Pin

宋立荣 SONG Li-Rong

吴灶和 WU Zao-He

肖 伟 XIAO Wei

熊邦喜 XIONG Bang-Xi

杨先乐 YANG Xian-Le

游 力 YOU Li

Harald Rosenthal(德国)

常剑波 CHANG Jian-Bo

陈毅峰 CHEN Yi-Feng

洪云汉 HONG Yun-Han

李钟杰 LI Zhong-Jie

刘永定 LIU Yong-Ding

曲久辉 QU Jiu-Hui

唐启升 TANG Qi-Sheng

吴振斌 WU Zhen-Bin

谢 平 XIE Ping

熊思岳 XIONG Si-Yue

于 丹 YU Dan

张奇亚 ZHANG Qi-Ya

编辑部 Editorial office 杜新征 DU Xin-Zheng 王 芹 WANG Qin 余 茜 YU Xi