【研究简报】

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞质中的
二硫键蛋白质王 台^① 門倉広^② 山崎真狩^②

(①中国科学院植物研究所, 北京 100093; ②东京大学农学生命科学部, 东京日本 113)

关键词 枯草杆菌 细胞质 二硫键蛋白质

二硫键是维持蛋白质二维和三维结构的重要因素之一, 目前已知的二硫键蛋白质主要存在于细胞周质(Periplasm)或真核细胞的细胞器中, 大多数是分泌蛋白质或是膜蛋白质, 很少存在于细胞质内^[1,2]. 一般认为细胞质的高还原势是其缺乏二硫键蛋白质的重要原因^[1], 但是, 细胞环境不是影响二硫键形成的唯一因素, 在细胞(*Escherichia coli*)的细胞周质内已发现3个能催化二硫键形成的蛋白质, 它们是分泌蛋白质形成二硫键必需的^[3,4]. Derman等^[1]将细菌中硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin reductase)的基因缺失后, 发现在细菌细胞质中合成的外源碱性磷酸酶及其他外源蛋白质能形成二硫键, 认为细胞质有催化二硫键形成的机制, 只是某些因素如硫氧还蛋白还原酶阻止了二硫键的形成. 本文报道了枯草杆菌细胞质中的一个二硫键蛋白质, 并讨论了细胞发育状态对该蛋白质合成的影响.

1 材料与方法

(i) 菌株和培养条件. 实验用菌株是枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) DB101(*his*).

除特别注明外, LB培养基被用于常规培养, 培养温度是37℃.

孢子形成(sporulation)实验用 Schaeffer 孢子形成培养基(SSM). 细胞经80℃热处理10 min, 用 Tryptose blood 琼脂培养基附加0.5%葡萄糖检测孢子的形成情况.

(ii) 总蛋白质的提取. 细胞于37℃在含10 mL培养基的L形试管中培养, 至后对数期($OD_{550} = 1$)或至所需要的时间. $8\,000 \times g$ 离心10 min收集细胞. 将细胞悬浮于SDS样品缓冲液^[5]中, 超声波破碎, $12\,000 \times g$ 离心15 min去掉细胞碎片, 取上清液. 用Laemmli^[5]的方法进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE).

(iii) 原生质体的分离. 细胞在10 mL LB培养基中于37℃生长至后对数期. 于 $8\,000 \times g$ 离心10 min收集细胞. 细胞经缓冲液A(50 mmol/L Tris-Maleate pH 7.2)冲洗两次后, 悬浮于1 mL缓冲液B(50 mmol/L Tris-Maleate pH 7.2, 含0.5 mol/L蔗糖, 5 mmol/L $MgCl_2$ 和500 $\mu g/mL$ 纤维素酶), 在37℃保温并缓慢摇动, 镜检细胞壁降解情况. 原生质体经 $3\,000 \times g$ 离心10 min收集, 再悬浮于5 mL无纤维素酶的缓冲液B中. 悬浮液在 $3\,000 \times g$ 离心10 min, 沉淀的原生质体用缓冲液C(10 mmol/L 磷酸钠 pH 6.8, 含2 mmol/L EDTA 和1 mmol/L PMSF)表面冲洗后, 悬浮于缓冲液C中.

(iv) 细胞质的制备. 用15 s的超声波或3个循环的干冰/乙醇速冻和28℃溶化^[1]破碎原生质体. $10\,000 \times g$ 离心10 min去掉未破碎的原生质体, 取上清液. 上清液在 $100\,000 \times g$ 离心90 min. 最终的上清液为细胞质组分, 沉淀为膜组分.

(v) 二硫键蛋白质的分析. 将细胞质蛋白质按 3:1 与 4 倍浓度的含巯基乙醇(β -ME)或不含 β -ME 的 SDS 样品缓冲液混合, 在沸水浴中加热 4 min. 用前者进行的 SDS-PAGE 称还原型 SDS-PAGE(简称 R), 用后者进行的 SDS-PAGE 称非还原型 SDS-PAGE(简称 N 或 N').

(vi) SDS-PAGE. 依照 Laemmli^[5]的方法, 进行 SDS-PAGE. 浓缩胶浓度为 4.5%, 分离胶浓度为 12%. 凝胶用 0.1% 考马斯亮蓝、50% 甲醇和 10% 醋酸溶液染色, 5% 甲醇-7% 醋酸脱色. 除特别注明外, 所用电泳均为还原型 SDS-PAGE.

(vii) 蛋白质的 N-端序列分析. 蛋白质经 SDS-PAGE 分离后, 依照 Matsudaira^[6]的方法将其转移至 PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜上. 用 Applied Biosystem Model 477A 蛋白质序列分析仪测定 N-端序列.

2 结果与讨论

2.1 细胞质二硫键蛋白质的特征

在非还原型的 SDS-PAGE 中, 许多二硫键蛋白质的氧化型比还原型迁移得稍快, 主要是由于氧化型的蛋白质有更紧密的结构. 因此一种蛋白质在还原型 SDS-PAGE 和非还原型 SDS-PAGE 中迁移率的差异是测定其是否含二硫键的一种灵敏的方法^[7]. 用这种方法分析枯草杆菌的总蛋白质时, 发现一个含量较丰富的蛋白质仅出现在还原型 SDS-PAGE 胶上, 这个蛋白质的分子量是 23 ku, 简称 P23; 而在非还原型 SDS-PAGE 胶中有一个比 P23 迁移率稍快的蛋白质带(图未显示). 比较细胞质、细胞膜和培养介质

中蛋白质的 SDS-PAGE 图谱(图 1), 证明 P23 是一个细胞质蛋白质. 上述结果初步表明 P23 可能是一个含二硫键的细胞质蛋白质(简称二硫键蛋白质).

我们从原生质体分离细胞质用两种方法验证这一假设. 第一, 用 15 s 的超声波破碎原生质体, 随后用还原型 SDS-PAGE (R) 和非还原型 SDS-PAGE (N 或 N')

分析细胞质蛋白质. 同样仅在 R 中发现 P23. 有意义的是, 介于 R 和 N 之间的 N' 中的一条蛋白质带, 其一半迁移率与 R 中的 P23 相同, 另一半迁移率比 P23 稍快, 与 N 中的一条蛋白质带相同(图 2(a)). 这表明 P23 是一个二硫键蛋白质, N 中的蛋白质带是 P23 的氧化型, R 中的是氧化型的 P23 在体外被巯基乙醇(β -ME)还原的结果, N' 中的上述现象是由于部分氧化型的 P23 被来源于 R 中的 β -ME 还

图 2 细胞质二硫键蛋白质的鉴定
(a) 用 15 s 超声波破碎原生质体; (b) 用 3 个循环的干冰/乙醇速冻和 28°C 融化破碎原生质体. 箭头表示 P23 的位置. R 为还原型 SDS-PAGE, N 和 N' 为非还原型 SDS-PAGE

图 1 23 ku 蛋白质(P23)的细胞定位
T 为总蛋白质, C* 为粗细胞质蛋白质, 包含细胞周质(periplasm)的蛋白质, C 为细胞质蛋白质, M 为膜蛋白质, S 为培养介质中的蛋白质

图 3 氧化型 P23(oxiP23)和还原型 P23(reP23)的确定以及不同浓度二硫苏糖醇(DTT)对 oxiP23 和 reP23 的影响

(a)说明同图 2(b);(b)细胞质蛋白质经不同浓度 DTT 处理后,用非还原型 SDS-PAGE 分离

原的结果。第二,由于超声波可能会造成一个氧化环境。为了避免这一问题,采用 3 个循环的干冰/乙醇速冻和 28℃ 融化的方法破碎原生质体,用还原型和非还原型 SDS-PAGE 分析细胞质蛋白质,得到与上述一样的结果(图 2(b))。这些实验初步表明 P23 是一个二硫键蛋白质,在细胞质中以氧化型存在。

用不同浓度的二硫苏糖醇(DTT)研究了二硫键还原剂对 P23 二硫键的影响。细胞质蛋白质经 0(对照),1,5,10,20,50 和 100 mmol/L DTT 处理后,用非还原型 SDS-PAGE 分离,以检测 P23 的存在状态。对照中的 P23 是氧化型。用 1 mmol/L DTT 处理后,氧化型和还原型的各占一半;随着 DTT 浓度增加,氧化型的减少,还原型的增加。当 DTT 浓度增

图 4 P23 合成的时间进程

(a)细胞的生长曲线;(b)蛋白质电泳图谱,最上行是培养时间(h)

加到 100 mmol/L 时,P23 几乎完全变为还原型(图 3)。

2.2 P23 的 N-端氨基酸序列分析

测定结果表明 P23 的 N-端氨基酸序列是 SLIGKEVLPFEAKAF。用 SWISSPROT Database 经计算机检索发现 P23 与 *Salmonella typhimurium* 的烷基氢过氧化物还原酶(Alkyl hydroperoxide reductase)的 22 ku 亚基的 N-端序列有 46.7% 的同源性。烷基氢过氧化物还原酶由一个 52 ku 亚基和一个 22 ku 亚基组成,受过氧化氢诱导,与抗氧化伤害有关^[8]。目前尚不知 P23 的功能。

2.3 培养时间和细胞的发育状态对 P23 的影响

细胞质中 P23 的含量与培养时间呈正相关。早对数生长期的细胞内含有极微量的 P23,

后对数生长期的细胞开始大量合成 P23, 静止期的细胞内含有丰富的 P23(图 4)。这种动态变化表明 P23 的合成受一定的特殊因子或细胞内环境调节。上述结果是否暗示早对数生长期的细胞比其他时期的细胞有较高的还原势呢?

枯草杆菌是芽孢菌, 孢子形成被认为是一种原始的细胞分化方式, 涉及到复杂的生理生化变化^[9]。比较在 SSM 培养基上培养 6 h (此时导致孢子形成的生化及分子生物学过程已完全启动^[9]) 和 24 h (此时用 Typtose blood 培养基检测发现几乎所有的细胞已形成孢子) 细胞的蛋白质电泳图谱发现孢子形成过程的细胞和孢子几乎不合成 P23(图 5)。

这二项结果均表明 P23 的合成肯定受某些特殊的因子或细胞内环境调节。

2.4 小结

本文已初步表明 P23 是一个细胞质二硫键蛋白质, 主要存在于后对数期和静止期的细胞内, 在早对数期细胞和 SSM 培养基生长的细胞中几乎不存在。因此 P23 的合成受特殊的因子或细胞内环境调节。后对数期和静止期的细胞可能有着比早对数期细胞低的还原势或其他因子。总之细胞质有催化二硫键形成的能力, 这与 Derman 等^[1]用突变体实验所得的结论一致。

图 5 孢子形成及不同培养基对 P23 合成的影响
细胞生长在 LB 培养基或 Schaeffer 孢子形成培养基 (SSM) 于 37℃ 培养 6 h 或 24 h

致谢 本工作为日本政府、联合国教科文组织和国际细胞学联合会资助课题。

参 考 文 献

- 1 Derman A I, Prinz W A, Belin D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Science, 1993, 262: 1 744~1 747
- 2 Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 7 084~7 088
- 3 Shevchik V, Condemine G, Robert-Baudouy J. Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. EMBO J, 1994, 13: 2 007~2 012
- 4 Bardwell J C A, McGovern K, Beckwith J. Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. Cell, 1991, 67: 581~589
- 5 Laemmli K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680
- 6 Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem, 1987, 262: 10 035~10 038
- 7 Scheele G, Jacoby R. Conformational changes associated with processing of presecretory proteins allow glutathione-catalyzed formation of native disulfide bonds. J Biol Chem, 1982, 257: 12 277~12 282
- 8 Jacobson F S, Morgan R W, Christman M F, et al. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. J Biol Chem, 1989, 264: 1 488~1 496
- 9 Maruo B, Yoshikawa H. *Bacillus subtilis*: Molecular Biology and Industrial Application, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo: Elsevier, 1989

(1997-01-12 收稿, 1996-03-21 收修改稿)