

丙酮丁醇梭菌磷酸化蛋白质组分析

白雪, 赵晶晶, 王倩, 童维, 张继远, 訾金, 陈真, 刘斯奇, 王全会

中国科学院北京基因组研究所 蛋白质组学实验室, 北京 101300

摘要: 近年的研究揭示, 细菌细胞中蛋白质的磷酸化状态可能调节信号或代谢通路的生物活性。丙酮丁醇梭菌是一个重要的工业菌株, 在酸性条件下能够生成大量的有机溶剂。然而, 调节丙酮丁醇梭菌有机溶剂生成的分子机制尚未完全阐明。采用双向电泳和质谱联用的技术, 比较了该菌在产酸期与产有机溶剂期间的差异蛋白质谱图。特别关注了那些分子量接近但具有不同等电点的蛋白质。在高有机溶剂生成速率的丙酮丁醇梭菌中, 发现了 8 个电泳斑点簇呈现明显的酸移而且伴随光密度强度的变化。质谱分析数据表明, 这些蛋白质均含有磷酸化修饰的肽段。生物信息学分析预示, 这些蛋白质参与了有机溶剂的生成过程。但究竟它们的磷酸化状态如何调控有机溶剂生成仍需更为深入地研究。

关键词: 丙酮丁醇梭菌, 双向电泳, 磷酸化蛋白质组学

Phosphoproteomic investigation of *Clostridium acetobutylicum*

Xue Bai, Jingjing Zhao, Qian Wang, Wei Tong, Jiyuan Zhang, Jin Zi, Zhen Chen, Siqi Liu,
and Quanhui Wang

Department of Proteomics, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China

Abstract: Protein phosphorylation in bacteria is important for signaling and metabolic activity. *Clostridium acetobutylicum* can synthesize high yield of organic solvent under acidic condition. How solventogenesis is regulated at molecular level in this bacterium, is not clearly elucidated yet. We used two dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry to have a differential analysis of the bacterial proteins from *Clostridium acetobutylicum* at acidogenic and solventogenic stage. We focused on these iso-spots with similar molecular mass and different pI values. Totally, eight string spots were identified, which displayed significant changes of pI values as well as spot volumes in response to solventogenic development. The data acquired from mass spectrometry demonstrated that all of the iso-spots contained the phosphorylated peptides. Bioinformatic analysis revealed that these proteins partake in the pathways of solvent synthesis.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*, 2-dimensional electrophoresis (2-DE), protein phosphorylation

丙酮丁醇梭菌属于梭菌属, 因其能够产生丙酮、丁醇和乙醇而得到了较为广泛的研究。尽管丙酮丁醇梭菌能够生产有机溶剂, 但是其生成的效率较低, 长期以来在工业界没有得到重视。近年来随着石油

资源的大量消耗和人们环保意识的逐渐增强, 开发取代石化工业的技术和方法得到越来越多的重视。因此, 人们正在重新评估丙酮丁醇梭菌的工业化的潜在价值^[1]。

Received: July 26, 2010; **Accepted:** September 28, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707801), National Natural Science Foundation of China (No. 30800023).

Corresponding author: Quanhui Wang. Tel: +86-10-80485327; Fax: +86-10-80485324; E-mail: wangqh@genomics.org.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707801), 国家自然科学基金项目 (No. 30800023) 资助。

一般认为,丙酮丁醇梭菌的工业化前景在于提高该菌的单位有机溶剂的产量。丙酮丁醇梭菌在对数生长期的代谢产物以乙酸、丁酸等有机酸为主,而当进入生长稳定期,外界 pH 值下降至 4.5 左右时产物主要是丙酮、丁醇和少量乙醇。因此,一种提高有机溶剂产量的方法是在发酵过程中对培养基的酸碱度进行适当的控制。早在上世纪 80 年代,有人试图通过调整胞外 pH 提高有机溶剂产量^[2],或尝试在中性条件下促进有机溶剂合成^[3]。然而,这些努力的效果并不明显。这样,采用基因工程技术改造丙酮丁醇梭菌就成为一个首要考虑的技术选择。目前,关于该菌的产有机溶剂的机理和通路已基本研究清楚,而且丙酮丁醇梭菌的分子操作方法也已成熟。有些科学家尝试了在基因组水平上进行某些关键基因的突变,并获得了某些有机溶剂产量有所提高的菌株,如 Spo0A 突变菌株等^[4]。但是总体而言,基因改造的结果不尽如人意。究其原因,在于人们对于丙酮丁醇梭菌中有机溶剂生成通路的调控机制仍不甚了解。如果仅从一两个基因的改造着手,无法在整体上改善代谢通路的效率。因此,从全局角度来分析丙酮丁醇梭菌的代谢通路,了解参与通路的各种蛋白质的变化,可能是实现丙酮丁醇梭菌基因改造的前提。

长期以来,细菌蛋白质的磷酸化一直未被充分地认识。随着蛋白质组学技术的发展,人们发现细菌蛋白质的磷酸化也是广泛存在的,而且在信号和代谢通路的调节中扮演重要角色^[5-7]。然而,丙酮丁醇梭菌中蛋白质的磷酸化尚未见报道。我们假设,该菌的磷酸化状态可能在有机溶剂合成通路中起着某种调节功能。在本研究中,我们采用蛋白质组学的手段,对丙酮丁醇梭菌标准菌株 ATCC824 在产酸期和产溶剂期间的蛋白质组进行了比较分析。在这种分析中,我们特别注重分析那些等电点发生明显酸移的蛋白质,以寻找与有机溶剂生成相关的磷酸化蛋白质。

1 材料与方法

1.1 确定丙酮丁醇梭菌产酸期和产有机溶剂期

以丙酮丁醇梭菌 ATCC824 菌株作为研究对象。

采用传统的梭菌培养基进行培养,其成分为: K_2HPO_4 0.75 g/L, KH_2PO_4 0.75 g/L, NaCl 1.0 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $MgSO_4$ 0.4 g/L, 蛋白胨 2.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, 葡萄糖 50.0 g/L。在培养过程中,监测培养基的 pH 值在不同时间点上变化,同时收集培养液进行 HPLC 示差折光检测器分析,使用的分析柱为 Aminex HPLC HPX-87H (biorad, 300 mm×7.8 mm),是由聚苯乙烯二乙烯苯树脂填充而成的有机酸柱,柱温 15℃,流动相为 0.05 mmol/L H_2SO_4 ,流速 0.5 mL/min。我们由此判断培养基中有机溶剂的产率,从而界定丙酮丁醇梭菌产酸期和产有机溶剂期。

1.2 细菌培养与蛋白提取

采用 5 000 ×g、4℃离心 15 min 的方法分别收集产酸期和产有机溶剂期的菌体。经过 3 次 Tris-HCl 洗涤后,将菌体重悬于裂解缓冲液 (15 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS) 中,并加入蛋白酶抑制剂 (1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT) 和磷酸化酶抑制剂 (氟化钠,原钒酸钠,焦磷酸钠,甘油磷酸酯等),超声 3 min 使菌体裂解。将裂解物在 4℃、20 000 ×g 离心 30 min。取上清,并在其中加入 10 倍体积三氯乙酸冰丙酮溶液后于 -20℃放置过夜。所得沉淀即为丙酮丁醇梭菌蛋白质。

1.3 双向电泳及胶图分析

选取 pH 范围为 4~7 的 18 cm 胶条 (GE Health),取 200 μg 蛋白样品,在其中加入 0.5% DTT 和 0.2% IPG 缓冲液,并用水化缓冲液补充体积至 350 μL 后上样。聚焦程序设置为 20℃水化 8 h, 50 V 主动水化 4 h, 500 V 快速升压 1 h, 1 000 V 线性升压 1 h, 4 000 V 线性升压 1 h, 4 000 V 聚焦至 36 000 VH。经过 1% DTT 和 2.5% IAM 平衡后,进行第二维 SDS-PAGE 电泳。电泳程序设置为 5 W 恒功率电泳 0.5 h, 25 W 恒功率电泳至溴酚蓝前沿移动到胶面底端。用硝酸银染色法处理双向电泳胶。采用 Image Master 软件对丙酮丁醇梭菌不同生长时期的双向电泳胶图进行比对分析。光密度变化 3 倍以上的双向电泳斑点定义为差异蛋白点。

1.4 蛋白质的质谱鉴定

将差异的电泳斑点切割下来, 通过水化、脱水等过程直至胶粒完全变白为止。在 25 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 7.0~8.0) 条件下加入 0.01 g/L 胰蛋白酶, 在 37°C 保温过夜。加入终浓度为 0.1% 的甲酸终止消化反应。在液相色谱-质谱联用鉴定中, 我们采用 100 mm×75 μm C18 反向柱 (由本实验室自制) 与 HCTultra (Bruker-Dalton 公司) 质谱相连。在 30 min 内 B 液 (B 液 95% 乙腈, 0.1% 甲酸, A 液 5% 乙腈, 0.1% 甲酸) 的浓度由 2% 上升至 40%, 流速为 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在一级质谱中信号最强的 3 个离子峰被用于二级质谱检测, 二级质谱信号阈值为 3 000。

在肽段鉴定中我们采用 Mascot 搜索软件, 所选数据库为由 NCBI 下载的丙酮丁醇梭菌数据库。一

级质谱与二级质谱分质量耐受值均设为 0.5 Da 和 0.5 Da, 烷基化修饰作为固定修饰, 甲硫氨酸氧化和丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸磷酸化作为可变修饰。所有搜索到的磷酸化肽段都是基于原始质谱峰图上是否存在中性丢失现象判断的。

2 结果

2.1 产酸期和产有机溶剂期的确定

如图 1 及图 2 所示, 在培养 7~10 h 后, 细菌培养基的 OD 值约为 0.5, pH 约为 5.2~5.7 之间, 细菌的代谢产物主要以乙酸为主, 此阶段被认定为产酸期; 当培养 16~18 h 后, OD 值上升至 0.6 以上, pH 下降到 4.5 以下, 产物以丙酮等有机溶剂为主, 此阶段被认定为产有机溶剂期。

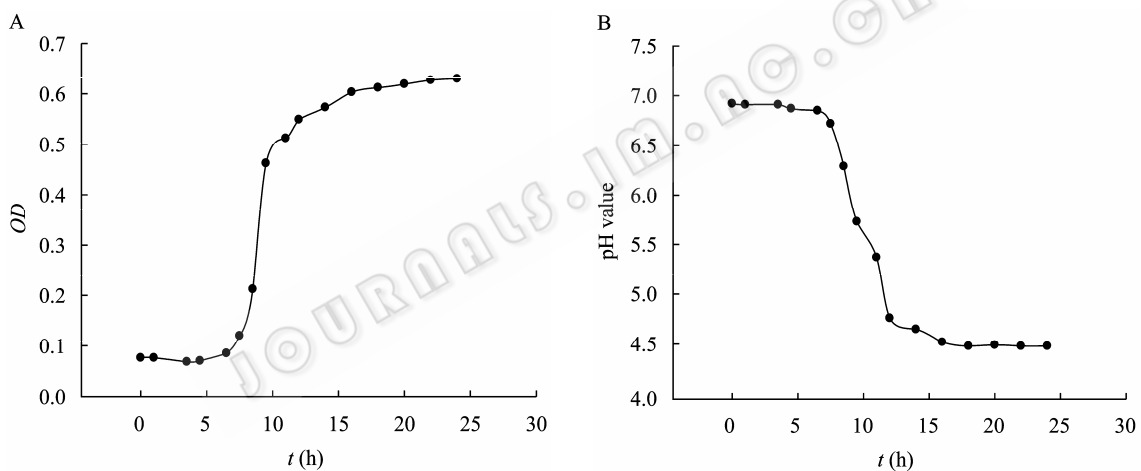


图 1 丙酮丁醇梭菌生长曲线及对应时间点培养基的 pH 变化

Fig. 1 The changes of optical intensity and pH values of medium during the cultivation. (A) The optical intensity change curve. (B) The pH value change curve.

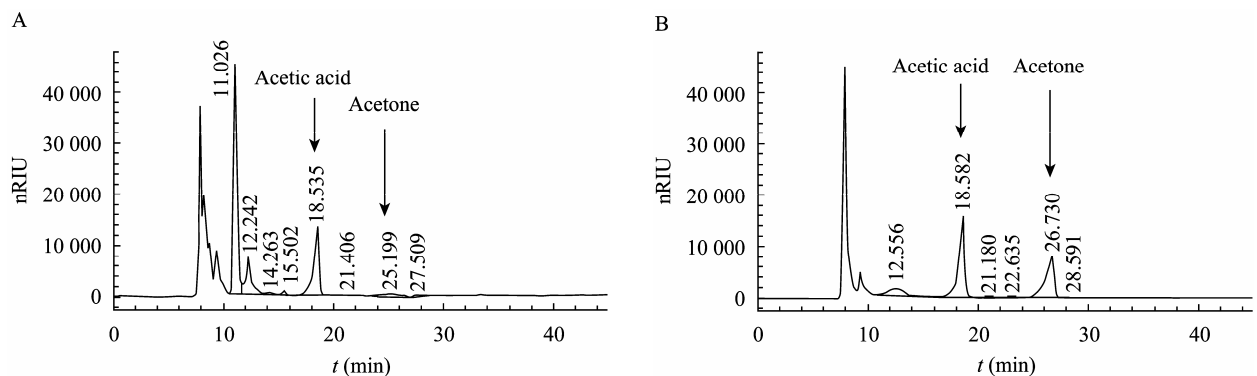


图 2 丙酮丁醇梭菌代谢产物的高效液相色谱分析

Fig. 2 HPLC profiles of the metabolic products of *C. acetobutylicum*. (A) The solvent production in acidogenesis of *C. acetobutylicum*. (B) The solvent production in solventogenesis of *C. acetobutylicum*. Acetic acid and acetone are marked as reporters of different growth stages.

2.2 双向电泳胶图分析

丙酮丁醇梭菌全蛋白在双向电泳胶上得到了很好的分离, 图 3 为该菌产酸阶段和产有机溶剂阶段蛋白质的双向电泳图谱。胶图分析表明, 产酸期与产有机溶剂期的丙酮丁醇梭菌蛋白质在电泳斑点的数量与 pI 分布上均呈现显著不同的模式。在产酸期的双向电泳斑点数为 375 个, 其中 25 个为产酸阶段特有的; 产有机溶剂期双向电泳斑点数为 417 个, 其中 31 个为该阶段特有。在这些电泳胶图中, 我们

关注那些成串斑点簇, 即分子量相同但等电点不同的相邻电泳斑点, 这提示蛋白质可能存在修饰状态。

在 2 个时期的成串斑点簇的分布基本相同, 共有 10 个, 其中有 2 个斑点簇在产酸和产有机溶剂阶段没有显著改变; 但是 8 个斑点簇发生了改变。图 4 列举了其中 8 个成串斑点, 有 7 个斑点簇在产有机溶剂期发生了显著的斑点酸移且伴有斑点光密度增加; 有一个斑点簇在产酸期发生了显著的斑点酸移且伴有斑点光密度增加。

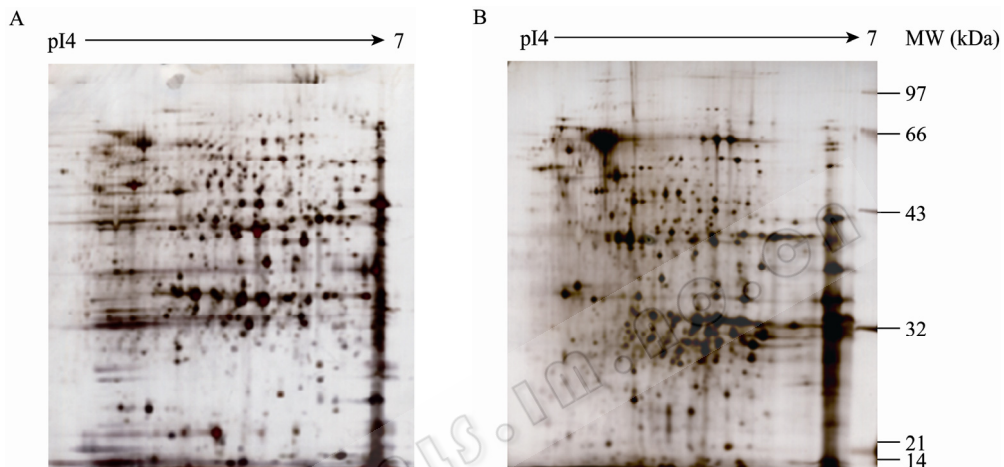


图 3 丙酮丁醇梭菌双向电泳图谱

Fig. 3 2-DE gel image of *Clostridium acetobutylicum*. (A) The gel image of proteins from *Clostridium acetobutylicum* in acidogenesis. (B) The gel image of *Clostridium acetobutylicum* in solventogenesis.

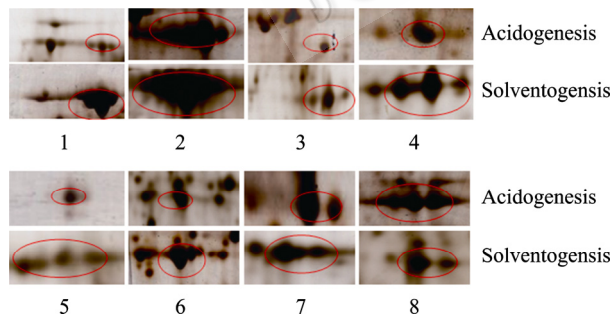


图 4 不同生长阶段成串斑点簇胶图比较

Fig. 4 Comparison of string spots in 2-DE images of *C. acetobutylicum*. Upper panel: the string spots of acidogenesis; lower panel: the string spots of solventogenesis.

2.3 磷酸化蛋白质的鉴定

双向电泳胶图上的斑点酸移是蛋白质可能发生磷酸化修饰的物理特征, 但不是确定的化学修饰信号。为了进一步确证这些斑点簇是否含有磷酸化蛋白质, 我们采用质谱分析的方法检测磷酸化肽段。在肽段的质谱图中, 如果一个肽段有明显的“中性

丢失”现象, 即在二级质谱中的某肽段质量信号同时伴有 98 或 80 的质量偏移的信号, 而且该肽段含有可被磷酸化的氨基酸基团, 那么这个肽段就可能是一个磷酸化肽段。我们依据中性丢失这一原则来判断所选择的电泳斑点是否发生了磷酸化修饰。

我们对上述 10 个成串斑点簇的所有斑点都进行了胰蛋白酶消化处理和质谱鉴定。如图 5 所示, 该磷酸化蛋白的二价母离子峰为 644.31, 在二级质谱峰图中可以清晰地看到其质荷比向左偏移至 595.3, 偏移量为 49 ($m=98$ Da, $z=2$), 恰好为一个二价中性丢失偏移。质谱数据表明, 9 个斑点簇被鉴定为含有丙酮丁醇梭菌蛋白质, 而且在同一斑点簇中的所有斑点均为同一蛋白质。其中有 8 个蛋白质含有磷酸化肽段, 只有乙酰乙酸脱羧酶所产生的肽段没有发现中性丢失现象。我们进一步分析这些磷酸化的蛋白质在产酸和产有机溶剂阶段的丰度特

征, 发现 5 个在产有机溶剂阶段高丰度, 1 个在产酸阶段高丰度, 另外 2 个丰度变化不明显, 见表 1。

2.4 磷酸化蛋白质的功能预测

我们采用修饰预测、拓扑学、保守区域、功能聚类等生物信息工具, 分析了这 8 个蛋白质的生物学功能。发现 2 个蛋白质 (Predicted membrane protein 和 Oligopeptide ABC transporter) 可能定位于

细胞膜; 3 个蛋白质 (Fructose 1,6-bisphosphatase II, Phosphomannomutase, Pyruvate kinase) 可能参与了碳源代谢; 有 3 个蛋白质 (Molecular GroEL, Elongation factor Tu, Oligopeptide ABC transporter) 参与了蛋白质和多肽代谢。另外, 我们所鉴定到的磷酸化位点与预测结果相吻合, 进一步说明了该实验结果的可信性。

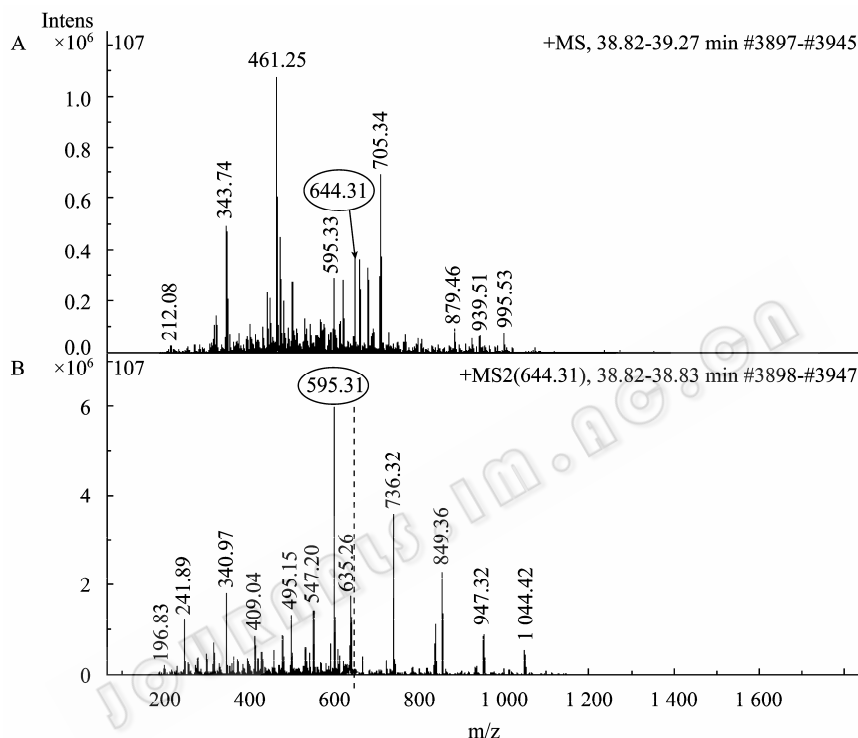


图 5 磷酸化蛋白质 Phosphomannomutase 的质谱图谱

Fig. 5 The mass spectrum of phosphorylated protein Phosphomannomutase. (A) The MS spectrum of peptides eluted at 39.29 min, including the phosphorylated one (highlighted with circle). (B) The MS/MS spectrum of precursor ion 644.31. The sequence of this precursor is AGIVIpTASHNPK, and there is neutral loss of 49.0 between fragment ion of 644.31 and 595.31 (highlighted with circle).

表 1 丙酮丁醇梭菌中成串斑点簇中鉴定的蛋白质及其磷酸化肽段

Table 1 Proteins identified from the string spots and the phosphorylated peptides identified by mass spectrometry

Number of protein	Protein name	Expression status in solventogenesis	Phosphopeptides
1	Molecular chaperone DnaK	↑	RQpSITNPK NpTTIPTRK
2	Chaperonin GroEL	↑	VEDLGSAEpSVKISK
3	Phosphomannomutase	↑	IpSERYILNEpYILNEK AGIVIpTASHNPK
4	Fructose 1,6-bisphosphatase II	↑	IESDKpSYpTVK
5	Predicted membrane protein	↑	GDpTATALSK
6	Elongation factor Tu	↓	TVGpSGVVpTSIIE; NMIpTGAAQMDGAILVVSAADGMPQTR
7	Pyruvate kinase	N	TKMIFpTVGPASETTEEIVTAFIK
8	Oligopeptide ABC transporter	N	pSEKPKpSTK

↑ stands for up regulation; ↓ stands for down regulation; N stands for no obvious changes; p stands for phosphorylated site.

3 讨论

本研究通过双向电泳比较和 ESI-trap 质谱鉴定,首次分析了丙酮丁醇梭菌在产酸期与产有机溶剂期磷酸化蛋白质组的变化。以往关于丙酮丁醇梭菌的报道虽然很多,但仅仅局限于双向电泳胶图中胶点的差异分析,并没有关注蛋白质的翻译后修饰现象^[8]。而蛋白质的翻译后修饰在细菌的许多生理代谢过程中发挥着重要作用。其中, Balodimo 等分析发现丙酮丁醇梭菌中 GroEL 蛋白质的磷酸化修饰现象在热休克反应中有重要作用,可以帮助细菌适应外界温度的变化^[9]。在本研究中,我们发现在丙酮丁醇梭菌双向电泳胶图中存在若干分子量接近、等电点不同的成串胶点簇,提示这些胶点对应的蛋白质可能发生了翻译后修饰。进一步的质谱分析发现,这些胶点对应的蛋白质为磷酸化蛋白质。在丙酮丁醇梭菌由产酸期到产有机溶剂期的转化过程中,这些成串胶点簇大部分发生了酸移及光密度的增加,提示该菌中蛋白质磷酸化修饰的状态及含量在产有机溶剂期有明显增加。

研究表明,在细菌中的磷酸化修饰大部分发生在组氨酸和天冬氨酸残基,而本研究却仅发现了发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点上的磷酸化修饰。这可能说明丙酮丁醇梭菌中的组氨酸磷酸化修饰程度非常低。目前关于细菌磷酸化蛋白质的研究结果多是在大肠杆菌^[10]、枯草芽孢杆菌^[11]等模式菌中得出的,丙酮丁醇梭菌与这些菌株的同源性较低,并且丙酮丁醇梭菌具有产生大量有机溶剂的特点,这可能是该菌蛋白质磷酸化位点与其他细菌有很大不同的部分原因。

对丙酮丁醇梭菌磷酸化蛋白质组的研究,可能为进一步调控其有机溶剂的产量提供依据。已经有研究表明,细菌中蛋白质的磷酸化修饰参与信号转导及产物代谢等过程。本研究在丙酮丁醇梭菌中所发现的磷酸化蛋白质,大部分直接或间接地参与了有机溶剂的代谢过程。如分子伴侣蛋白 DnaK 与 GroEL 可能与对抗较高的有机溶剂浓度、蛋白质相互作用以及热激反应有关;而 Fructose 1,6-bisphosphatase II 和 Pyruvate kinase 直接参与了该菌的中心代谢途径,其修饰状态的变化很可能与有机溶剂的产量或产酸阶段向产有机溶剂阶段的转

换有着较为密切的关系。我们的研究结果表明蛋白质磷酸化修饰水平的变化极有可能参与丙酮丁醇梭菌产有机溶剂能力的调控。我们期望通过改变这些蛋白质磷酸化修饰程度,从而改变丙酮丁醇梭菌产有机溶剂的状态。此外,本研究对阐明该菌产有机溶剂和高浓度溶剂耐受能力的机制具有重要的参考意义。

REFERENCES

- [1] Grupe H, Gottschalk G. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(12): 3896–3902.
- [2] Huang L, Forsberg CW, Gibbins LN. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(6): 1230–1234.
- [3] Holt RA, Stephens GM, Morris JG. Production of solvents by *Clostridium acetobutylicum* cultures maintained at neutral pH. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**(6): 1166–1170.
- [4] Ravagnani A, Jennert KCB, Steiner E, et al. Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Mol Microbiol*, 2000, **37**(5): 1172–1185.
- [5] Mougous JD, Gifford CA, Ramsdell TL, et al. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(7): 797–803.
- [6] Klein G, Dartigalongue C, Raina S. Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2003, **48**(1): 269–285.
- [7] Mijakovic I, Petranovic D, Macek B, et al. Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(5): 1588–1596.
- [8] Schaffer S, Isci N, Zickner B, et al. Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis*, 2002, **23**: 110–121.
- [9] Balodimo IA, Rapaport E, Kashket ER. Protein phosphorylation in response to stress in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(7): 2170–2173.
- [10] Macek B, Gnad F, Soufi B, et al. Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cellular Proteomics*, 2008, **7**: 299–307.
- [11] Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, et al. The Serine/Threonine/Tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**: 697–707.