

嗜热自养甲烷杆菌 DX01 抗胁迫蛋白质的分离纯化与鉴定

丁霞¹ 闵航² 杨卫军^{2*}

(1. 南昌大学 生命科学与食品工程学院 江西 南昌 337000; 2. 浙江大学 生命科学学院 浙江 杭州 310058)

摘要: 从中国广东温泉分离得到一株嗜热自养甲烷杆菌 DX01 (*Methanothermobacter marburgensis* DX01)。分析嗜热自养甲烷杆菌 DX01 在不同生长温度的细胞全蛋白质图谱, 分离得到一个抗胁迫相关蛋白质——甲基辅酶 M 还原酶 I, 它在 70 °C 时上调表达, 以此帮助宿主抵抗高温引发的胁迫影响。PCR 克隆了甲基辅酶 M 还原酶 I 的基因全序列, 系统发育分析表明甲基辅酶 M 还原酶 I 在不同的产甲烷菌株中保守性很高, *M. marburgensis* DX01 与 *M. thermoautotrophicus* 和 *M. marburgensis* Marburg 的序列相似度分别是 97.6% 和 99.2%。实时定量 PCR 分析表明甲基辅酶 M 还原酶 I 在不同培养温度下的 MCR I mRNA 表达量有显著的差异, MCR I mRNA 表达量随着温度增加而增加。嗜热自养甲烷杆菌 DX01 菌株的抗胁迫相关蛋白质(甲基辅酶 M 还原酶 I)的分离为研究极端古菌适应极端环境提供了新线索。

关键词: 古菌; 嗜热自养甲烷杆菌; 甲基辅酶 M 还原酶; 胁迫

中图分类号: Q936 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0797-05

Clone and Expression Analysis of An Anti-stress Protein from *Methanothermobacter marburgensis* DX01

DING Xia¹, MIN Hang², Yang Wei-jun^{2*}

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 337000, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Thermophilic methanogen, *Methanothermobacter marburgensis* DX01, was isolated from a hot spring in China. The optimal temperature for its growth is 65 °C. In order to identify the gene potentially involved in the anti-stress protein in *M. marburgensis* DX01, prorein expression profiles in response to different growth temperature were investigated. The protein, up-regulated expression at 70 °C obviously, was cleaved out and sequenced by N-terminal amino acid sequences, which corresponded to Methyl-coenzyme M reductase I (MCR I), gamma subunit. Phylogenetic analysis showed that amino acid sequences of MCR I gene were conservative in the evolvement of methanogen, and consistent with the relationships that were established by 16S rRNA gene analysis on the whole. To examine the role(s) of MCR I of *M. marburgensis* DX01 in response to temperature, the MCR I mRNA expressions at different temperature were conducted using real-time PCR analysis. The MCR I mRNA expression increased highly at the culture temperatures 70 °C and was significantly lower at 50 °C. The results suggest that MCR I in *M. marburgensis* DX01 is temperature-dependent transcript and conservative in the evolvement of methanogen.

收稿日期: 2010-05-12 修回日期: 2010-06-17

基金项目: 江西省自然科学基金(2009GQN0091)和江西省教育厅基金(GJJ10048)

作者简介: 丁霞(1978-)女, 讲师, 博士, 主要从事环境微生物研究, E-mail: dingxia97@ncu.edu.cn; * 通讯作者: 杨卫军 教授, E-mail: w_jyang52@yahoo.com。

Key words: archaea; *Methanothermobacter marburgensis* DX01; Methyl - coenzyme M reductase I; stress

古菌一些奇特的生活习性和与此相关的潜在生物技术开发前景,长期以来一直吸引着许多人的关注。古菌常被发现生活于各种极端自然环境下,如大洋底部的高压热溢口、热泉、盐碱湖、厌氧环境等^[1-3]。古菌其古老的进化地位、奇特的生活习性和与此相关的潜在生物技术开发前景,赋予它迷人的科研价值。研究古菌对环境的适应性和耐受性之间的关系,有利于揭示古菌适应极端环境的分子机理。产甲烷菌(Methanogen)是一类形态多样并且具有特殊细胞成分以及产甲烷代谢功能的严格厌氧古菌,位于自然界碳循环厌氧食物链的末端,在碳物质循环中起着重要的作用。它们并非一定栖息在非常极端的环境,事实上,分布极为广泛,在污泥、瘤胃、昆虫肠道、变形虫的内共生体、人和动物的肠道、湿树木、地热泉水、深海热液口、碱湖沉积物、淡水和海洋沉积物、厌氧消化器等厌氧环境中都有产甲烷古菌的存在。嗜热自养甲烷杆菌,自养生长,转化 H_2 与 CO_2 为 CH_4 获得能量。生长速度相对于其它甲烷菌生长速度快,最适生长温度 $65\text{ }^\circ\text{C}$ ^[4-5]。

嗜热自养甲烷杆菌,转化 H_2 与 CO_2 为 CH_4 途径涉及到几个步骤。其中包括几个甲烷生成相关的酶,比如 MVH、FRH、F420 - MDH、H2 - MDH 和 MCR^[6]。合成甲烷的最后一步是由甲基辅酶 M 还原酶(MCR)完成的^[7]。甲基辅酶 M 还原酶是甲烷合成中的关键酶,分子量约 300 ku,由 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 3 个亚基组成^[8]。甲基辅酶 M 还原酶催化的反应在 H_2 与 CO_2 转化为 CH_4 步骤中是限速步骤,也是生物体重要调控位点^[9]。

嗜热自养甲烷杆菌生活在温泉或高温污泥中,周边环境经常会有较大波动,自身最适生长温度为 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 。嗜热自养甲烷杆菌采用什么样的策略来应对周边不适的环境?本文以一株分离自广东温泉的嗜热自养甲烷杆菌 DX01 为研究对象,分离高温条件下诱导表达的蛋白质,希望得到与温度相关的抗胁迫蛋白质。并对抗胁迫蛋白质进行初步的解析。

1 材料与方法

1.1 嗜热自养甲烷杆菌的培养

采用 hungate 技术厌氧培养嗜热自养甲烷杆菌^[10],培养基成分(g/L): K_2HPO_4 1.5; NH_4Cl 1.5; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1; yeast extract 1; sodium cysteine 0.5; $NaHCO_3$ 1.0; sodium resazurin 0.001; trace element solutions 10 mL ($g \cdot L^{-1}$): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.5; $NaCl$ 10; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; $CuSO_4$ 0.01; $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 0.01; H_3BO_3 0.01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025; $NaSeO_3 \cdot 6H_2O$ 0.0003; pH 7.0。121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。气相换气为 $H_2:CO_2 = 80:20$ 。

1.2 SDS - PAGE

不同温度下(40, 50, 60, 70 $^\circ\text{C}$)培养微生物超声破碎后,用体积分数为 12% 的 SDS - PAGE 进行电泳分离,考马斯亮蓝染色。

1.3 蛋白质 N 末端测序

SDS - PAGE 经电转仪转移到 PVDF 膜上,剪取目的条带用 ABI 氨基酸自动分析仪进行了氨基酸序列的测定。

1.4 甲基辅酶 M 还原酶 I (MCR I) 的克隆

根据蛋白质氨基酸的序列和其它甲烷菌的甲基辅酶 M 还原酶 I 的序列比对,设计引物 gamma F/R,上游引物 gamma F: 5' - ATGATATGG CACAATACT A - 3',下游引物 gamma R: 5' - TAGATTAT - GGCTGACAAAT - 3',以 *M. marburgensis* DX01 基因组为模板,利用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 54 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。TA 克隆后测序。序列提交 GenBank(EU807736)。

1.5 RNA 的提取

将不同条件培养的产甲烷菌,离心后,称量约 50 ~ 100 mg 菌体。液氮研磨后,采用 Trizol 试剂来进行总 RNA 的抽提。

1.6 反转录 (RT)

cDNA 的合成采用 SuperscriptTM/First-strand cDNA synthesis kit 来完成。在 200 μ L RNase-free 的离心管中混合约 1 μ g 的总 RNA 和 0.5 μ L 随机引物,加 DEPC 处理水至 3.5 μ L; 70 $^{\circ}$ C 5 min 变性,立即放到冰上。然后依次加入下列试剂: 2.5 μ L M-MLV 5 \times buffer 2.5 μ L 10 mM dNTPs 0.5 μ L RNase inhibitor 0.5 μ L M-MLV-RT 3 μ L DEPC 处理水。混合上述成分,离心,42 $^{\circ}$ C 温育 1 h,用于 PCR,或 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

1.7 Real-time PCR

使用特异性引物, MCRF: 5'-ATACCCAAGTGTTCACCCACCACT-3' 和 MCRR: 5'-ATGCCCT-TGACCTCACATATGGCT-3' 扩增基因片段,扩增产物长 178 bp。16S 基因作为内参。16S-TA 和 MCR-TA 质粒用 QIAquick plasmid Mini kit 提取纯化,计算质粒的浓度,最后用去离子水 10 倍梯度稀释成每 μ L 含有 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 和 10^9 个分子的 5 个样品。标准样品和各个样本同时在定量 PCR 仪上扩增。每个样品重复 3 次。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 读板; 72 $^{\circ}$ C 10 min。数据运用定量 PCR 软件进行计算。

2 结果

2.1 不同温度下的全蛋白质表达图谱

为了研究该菌抗胁迫相关蛋白质,采用在不同温度下(40, 50, 60, 70 $^{\circ}$ C) 培养细菌,对其进行全蛋白质表达图谱分析。SDS-PAGE 结果显示 70 $^{\circ}$ C 培养时,在约 30 ku 和 37 ku 处明显出现两条表达上调的蛋白质条带(图 1A, 箭头所示)。表明在高温下生长时,微生物会上调表达或特意表达某些蛋白质抵抗高温造成的胁迫作用。

2.2 抗胁迫相关蛋白质的氨基酸序列的解析

将 SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到尼龙膜上,将抗胁迫相关的 30 ku 的目的蛋白质条带剪下,经 ABI 氨基酸自动分析仪测定 N 端氨基酸序列。经序列比对为嗜热自养甲烷杆菌种的甲基辅酶 M 还原酶(I)的 gamma 亚基(图 1B)。

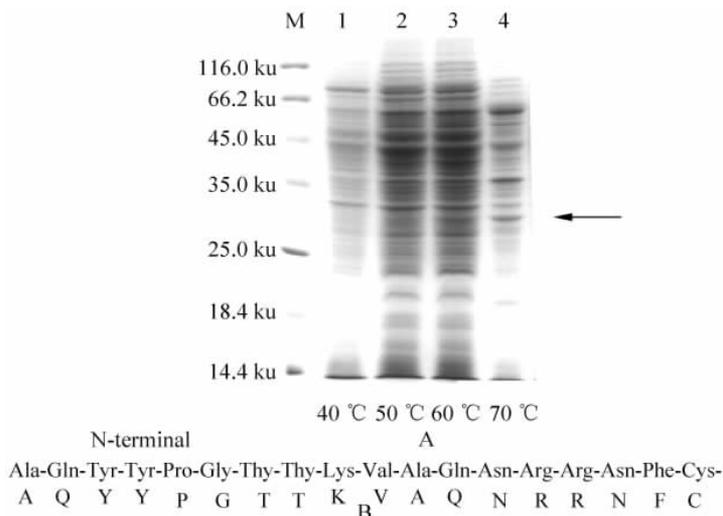
2.3 甲基辅酶 M 还原酶 I 的克隆与序列比对

根据蛋白质氨基酸的序列和其它

甲烷菌的甲基辅酶 M 还原酶 I 的序列比对,设计引物 gamma F/R,克隆了 *M. marburgensis* DX01 的关键酶——甲基辅酶 M 还原酶 I。经序列比对分析表明甲基辅酶 M 还原酶 I 在不同的产甲烷菌株中保守性很高, *M. marburgensis* DX01 与 *M. thermoautotrophicus* Δ H^T 和 *M. marburgensis* Marburg 的序列相似度分别是 97.6% 和 99.2% (图 2A)。结果表明产甲烷的关键酶非常保守,但不同菌株之间还是存在少量差异。另外,除了 *Methanosphaera stadtmanae*, MCR I 和 16S rDNA 的系统发育分析表明, MCR I 在进化上的与 16S rDNA 显示的进化距离总体上一致(图 2)。

2.4 不同培养温度对甲基辅酶 M 还原酶 I (MCR I) mRNA 表达的影响

利用定量 PCR 方法,对不同生长温度下甲基辅酶 M 还原酶 I mRNA 表达量进行了检测(50, 65, 70 $^{\circ}$ C)。结果表明,不同培养温度下的 MCR I mRNA 表达量有显著的差异(如图 3B)。当培养温度偏离最适生长温度(65 $^{\circ}$ C),在高温 70 $^{\circ}$ C 生长时, MCR I mRNA 表达量急剧增加,是 65 $^{\circ}$ C 时的大约 3 倍,而



箭头标注处为目标蛋白条带。

Arrow labeled the targeted proteins.

图 1 嗜热自养产甲烷菌 DX01 在不同温度培养下全蛋白图谱。

Fig. 1 SDS-PAGE of *M. marburgensis* DX01 at different cultured temperature

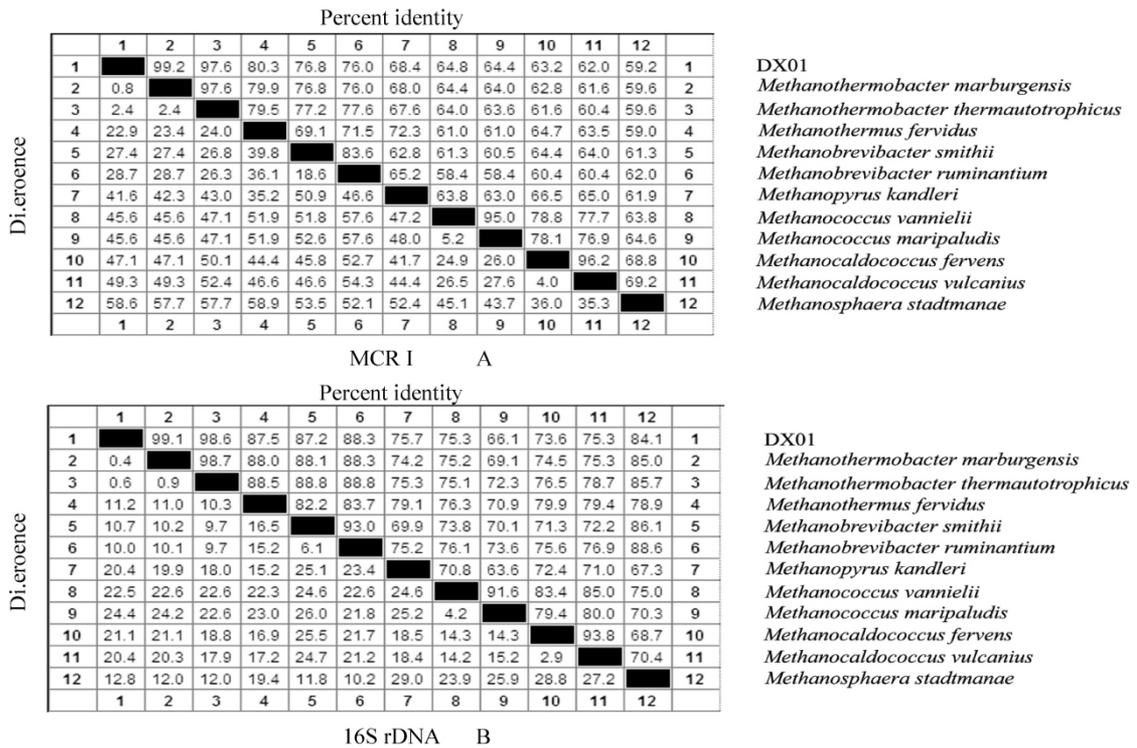
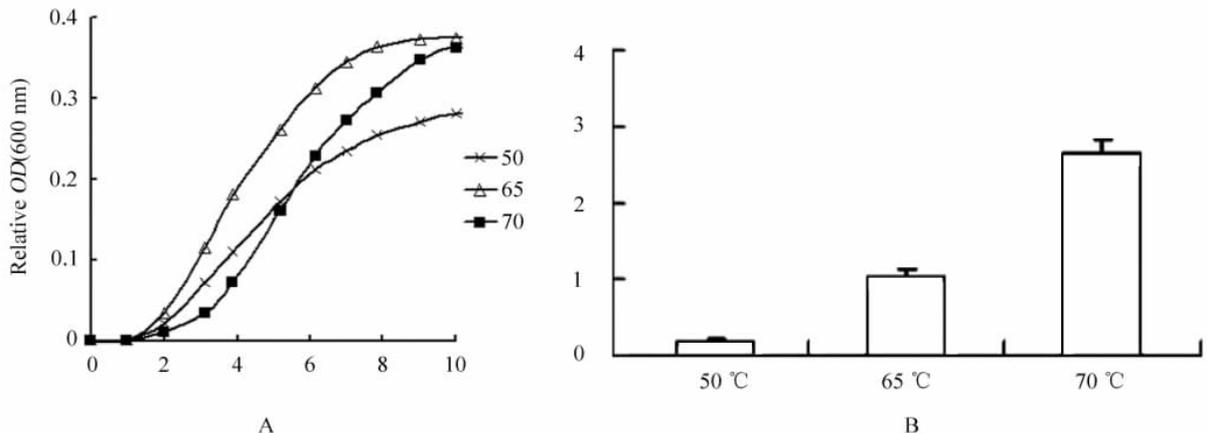


图 2 甲基辅酶 M 还原酶 I 序列比对

Fig. 2 Alignment of the methyl - coenzyme M reductase I , gamma subunit protein sequences



A: 不同温度嗜热自养甲烷杆菌 DX01 的生长曲线。B 嗜热自养甲烷杆菌 DX01 不同生长温度下的 MCR I mRNA 表达。不同温度下 MCR I mRNA 的绝对含量与 16S mRNA 绝对含量的比值作为其 MCR I mRNA 的表达水平。选取 65 °C 时 MCR I mRNA 表达量设为 1 其它样品则换算相应数值。结果用平均值 ± SEM 表示。

A: Growth curve of *M. marburgensis* DX01 at different cultured temperature. B: The level of MCR I mRNA was normalized by 16S rRNA levels and indicated in the respective growth temperature. The value of 65 °C was set to 1 and the rest of the value normalized. The results were expressed as means ± SEM.

图 3 嗜热自养甲烷杆菌 DX01 不同生长温度下的 MCR I mRNA 表达

Fig. 3 MCR I mRNA expression in *M. marburgensis* DX01 analysed by real - time PCR

在低温 50 °C 时 ,MCR I mRNA 表达量很少。表明 MCR I mRNA 的表达与温度相关 高温条件下 ,MCR I mRNA 表达量将增加。

3 讨 论

古菌常被发现生活于各种极端自然环境下 ,如大洋底部的高压热溢口、热泉、盐碱湖等。它古老的进化地位、奇特的生活习性和与此相关的潜在生物技术开发前景 ,长期以来一直吸引着许多人的注意。

相较于其它古菌,嗜热自养甲烷杆菌极端厌氧,利用唯一碳源 CO_2 形成甲烷代谢产物并获得能量,嗜热生长,这些独特的生理生化性质赋予它迷人的科研价值。

本研究用 Hungate 厌氧技术从温泉中分离纯化获得了一株嗜热产甲烷菌,命名为嗜热自养甲烷杆菌 DX01(*M. marburgensis* DX01)。已有报道表明,嗜热自养甲烷杆菌的形态随生长温度的改变,会发生较大的改变^[11]。嗜热自养甲烷杆菌 DX01 的形态也随生长温度而变化^[3]。嗜热自养甲烷杆菌古老的进化地位、奇特的生活习性和与此相关的潜在生物技术开发前景,赋予它迷人的科研价值。为了研究古菌的抗胁迫蛋白质,本研究通过不同温度下培养嗜热自养甲烷杆菌 DX01,获得 70 °C 下上调或特异表达的蛋白质。测序了 70 °C 上调表达诸多蛋白质中的一种,经序列比对为甲基辅酶 M 还原酶 I (MCR I) 的 gamma 亚基。甲基辅酶 M 还原酶是产甲烷途径生成甲烷的最后一个关键酶,在嗜热自养甲烷杆菌中存在 MCR I 和 MCR II 两种,他们在不同环境下(不同 H_2 分压,温度, pH 等)将调节表达比例来适应环境的变化^[9]。MCR I 在 70 °C 时的上调表达,反应了嗜热自养甲烷杆菌 DX01 的一种适应机制。对它的解析有助于了解嗜热甲烷菌的抗胁迫机理。

对嗜热自养甲烷杆菌的抗胁迫蛋白的研究将有助于认识古菌的抗胁迫机制,有助于了解甲基辅酶 M 还原酶的系统发育,为生命的起源和进化提供更多的线索。本文的研究为嗜热自养甲烷杆菌的抗胁迫机制的深入研究奠定了基础。

致谢:感谢日本东京大学帮助完成本研究的蛋白质 N 末端的测序工作。

参考文献:

- [1] Macario A J, Lange M, Ahring B K, et al: Stress genes and proteins in the archaea [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63 (4): 923 - 967.
- [2] Eckburg P B, Lepp P W, Relman D A. Archaea and their potential role in human disease [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(2): 591 - 596.
- [3] Ding X, Lv Z M, Zhao Y, et al. MTH1745, a protein disulfide isomerase - like protein from thermophilic archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicum* involving in stress response [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(2): 239 - 246.
- [4] Jones W J, Nagle D P, Jr, et al. Methanogens and the diversity of archaeobacteria [J]. *Microbiol Rev*, 1987, 51(1): 135 - 177.
- [5] Morgan R M, Pihl T D, Nolling J, et al. Hydrogen regulation of growth, growth yields, and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH [J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(3): 889 - 898.
- [6] Pennings J L, Vermeij P, de Poorter L M, et al. Adaptation of methane formation and enzyme contents during growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain deltaH) in a fed - batch fermentor [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 77(3): 281 - 291.
- [7] Bokranz M, Baumner G, Allmansberger R, et al. Cloning and characterization of the methyl coenzyme M reductase genes from *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170(2): 568 - 577.
- [8] Ermler U, Grabarse W, Shima S, et al. Crystal structure of methyl - coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation [J]. *Science*, 1997, 278(5342): 1457 - 1462.
- [9] Bonacker L G, Baudner S, Thauer R K. Differential expression of the two methyl - coenzyme M reductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* as determined immunochemically via isoenzyme - specific antisera [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 206(1): 87 - 92.
- [10] Balch W E, Fox G E, Magrum L J, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group [J]. *Microbiol Rev*, 1979, 43(2): 260 - 296.
- [11] Zeikus J G, Wolfe R S. Fine structure of *Methanobacterium thermoautotrophicum*: effect of growth temperature on morphology and ultrastructure [J]. *J Bacteriol*, 1973, 113(1): 461 - 467.