

# 高压二氧化碳杀灭大肠杆菌过程中的蛋白质变化研究

杨扬, 李欣, 饶伟丽, 陈丽, 张德权

(中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 本研究采用 37 °C、10~50 MPa 的高压二氧化碳 (HPCD) 处理大肠杆菌及其全蛋白溶液 30 min, 检测菌落总数、表观形态、蛋白质溶解性、蛋白质组和蛋白质二级结构的变化, 研究 HPCD 胁迫下大肠杆菌的蛋白质变化规律。结果表明: HPCD 处理压强升至 30 MPa, 菌落总数对数值有显著降低; 经不同压强处理, 菌体形态没有发生显著变化; 与对照组 (0.1 MPa) 相比, 可溶性蛋白经 20 MPa 的 HPCD 处理后含量显著降低, 从 1.77 mg/mL 降为 0.57 mg/mL, 并随压强继续上升逐渐降低; 30 MPa 的 HPCD 处理菌液, 经双向电泳分离到 46 个差异最大的蛋白点, 质谱鉴定具代表性的 16 个点, 分别涉及细胞骨架、新陈代谢、信号转换、运输与翻译等功能; 蛋白溶液圆二色谱结果显示, 对照组中  $\alpha$ -螺旋占 68.04%,  $\beta$ -折叠占 0.33%, 随 HPCD 处理压强增加,  $\alpha$ -螺旋含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。经 20 MPa 的 HPCD 处理,  $\beta$ -折叠含量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 但随压强继续增加含量变化不显著。

**关键词:** 高压二氧化碳; 大肠杆菌; 溶解性; 蛋白质组; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2014)5-118-124

## Analysis of Intracellular Proteins of *E. coli* Inactivated by High Pressure Carbon Dioxide

YANG Yang, LI Xin, RAO Wei-li, CHEN Li, ZHANG De-quan

(Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The variation of proteins in *E. coli* after 10~50 MPa HPCD treatment at 37 °C for 30 min was investigated in this study. The total bacterial counts, cell structure, protein solubility, proteome and secondary structure of protein were analyzed. The results showed that the logarithm of the total bacterial counts of *E. coli* after HPCD treatment was significantly decreased when the pressure increased to 30 MPa. The cell structure did not change with different HPCD treatments (10~50 MPa). The soluble protein content significantly decreased from 1.77 mg/mL to 0.57 mg/mL when the extraction of *E. coli* proteins was treated by 20 MPa HPCD in comparison with control (0.1 MPa treatment). The content of proteins decreased as the pressure of HPCD increased. Forty-six protein spots with the greatest expression difference were isolated from the control group and 30 MPa HPCD treatment group using two-dimensional gel electrophoresis. There were 16 representative protein spots were identified by MALDI TOF/TOF mass spectrometry, which were involved in cytoskeleton structure, cell metabolism, transmission of signal and transcription. The circular dichroism results of protein solutions showed that the  $\alpha$ -helix accounted for 68.04% and the  $\beta$ -sheet accounted for 0.33% in the control group. The  $\alpha$ -helix content significantly decreased ( $P < 0.05$ ) as the pressure of HPCD increased, while the  $\beta$ -sheet content significantly increased ( $P < 0.05$ ) when treated by 20 MPa HPCD, but no further change occurred when the pressure continued to increase.

**Key words:** high pressure carbon dioxide; *Escherichia coli*; solubility; proteome; secondary structure

高压二氧化碳 (High pressure carbon dioxide, HPCD) 杀菌是利用接近于或高于临界温度 (31.1 °C) 和临界压强 (7.38 MPa) 状态的二氧化碳对食品进行杀菌的技术。作为一种新型非热杀菌技术应用于食品

收稿日期: 2014-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171774)

作者简介: 杨扬 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为肉品科学与技术  
通讯作者: 张德权 (1972-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为肉品科学与技术

领域, HPCD 具有处理温度低、营养损失少、无污染、无残留的特点, 能够很好地保持食品固有的新鲜度、色泽和风味, 其良好的杀菌效果也被众多学者的研究证实<sup>[1]</sup>。因此, 关于 HPCD 杀菌技术效果与机理的研究成为非热杀菌领域关注的热点之一。

HPCD 能有效地杀灭微生物的营养细胞, 而对芽孢的杀灭效果稍差, 这成为 HPCD 技术推广的一个瓶颈。明确 HPCD 杀菌机理, 对于有针对性地改进杀菌条件, 推广 HPCD 技术很有必要。目前有关 HPCD 的

杀菌机理主要有几种观点<sup>[2]</sup>: (1) HPCD 处理过程中快速卸压, 细胞受到气体的急速膨胀而导致机械破裂;

(2) HPCD 独特的“萃取”能力发挥作用, CO<sub>2</sub> 的高溶解性使细胞质或细胞膜的一些重要成分流失到细胞外部; (3) CO<sub>2</sub> 溶解、渗透进入细胞内部降低其 pH 值, 低 pH 环境造成一些与新陈代谢相关的酶发生钝化, 同时 CO<sub>2</sub> 与细胞内产生的碳酸盐也会作为酶促反应的底物或产物影响相关反应的进行, 破坏微生物的代谢平衡, 使其死亡。而导致 HPCD 杀死微生物的主要原因尚未形成一个统一的观点。蛋白质作为微生物新陈代谢过程的物质基础, HPCD 对蛋白质或酶的影响很大程度上决定细胞的存活。因此, 本研究从 HPCD 处理前后酶或蛋白质变化的角度探讨其对微生物的影响。以遗传背景清楚的大肠杆菌为对象, 分析 HPCD 处理前后菌体的表观形态、蛋白质溶解性、双向电泳图谱和蛋白质二级结构的变化, 研究 HPCD 处理对蛋白质的影响规律, 为揭示 HPCD 的杀菌机理提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

菌种: 大肠杆菌 (*Escherichia coli* CICC 10003, *E. coli*) 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

培养基 (pH 7.0): 蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、葡萄糖 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL。

主要试剂材料: 尿素、硫脲、三羟甲基氨基甲烷 (Tris Base)、甘油、低熔点琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵, 美国 Sigma 公司; 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸 (CHAPS)、二硫苏糖醇 (DTT), Inalco Spa Milano 公司; 蛋白酶抑制剂, 瑞士 Roche 公司; 甘氨酸、牛血清蛋白标准品 (MW 68000), 美国 Amresco 公司; 考马斯亮蓝 G250, 瑞士 Fluka 公司; 碘乙酰胺、矿物油、IPG 缓冲液 (pH 3~10)、固相 pH 梯度胶条 (pH 3~10, 24 cm), 美国 GE 医疗集团; 溴酚蓝、丙酮、硫酸铵、无水乙醇等常用化学试剂均为分析纯, 北京化学试剂公司; 二氧化碳 (纯度 99.999%), 北温气体制造厂。

### 1.2 试验仪器

SFT-HPR-1000 高压 CO<sub>2</sub> 装置, 丹麦 Supercritical Fluid Technologies 有限公司; Neofuge 15R 型台式高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; T6 紫外可

见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; ML204/02 电子天平, 上海梅特勒-托利多有限公司; JY92-II DN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Ettan IPGphor 3 等点聚焦仪、Image Scanner III 扫描仪、ImageMaster 7.0 图像分析软件, 美国 GE 医疗集团; Ultraflex MALDI TOF/TOF 质谱仪, 德国 Bruker 公司; XL 30-ESEM 型扫描电镜, 荷兰 PhihPs 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种培养

挑取斜面培养基上大肠杆菌单菌落接种于 5 mL 液体培养基中, 于 37 °C 恒温静置培养 10 h 至稳定期, 将 5 mL 菌液转入 100 mL 液体培养基中, 37 °C 培养 5.5 h 至对数生长末期 (此时菌液浓度约为 10<sup>8</sup> cfu/mL) 备用。

#### 1.3.2 HPCD 处理

取对数生长末期菌液 100 mL, 4 °C 下 6000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 菌体用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 清洗 3 次, 重悬于等体积 (100 mL) 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中进行 HPCD 处理。处理前 HPCD 反应釜使用 75% 乙醇清洗 1 次, 无菌水清洗 2 次, 加热至设定温度后放入待处理菌液。HPCD 处理条件为: 温度 37 °C, 处理时间 30 min, 处理压强分别为 10 MPa、20 MPa、30 MPa、40 MPa、50 MPa。HPCD 升至预定压强所需时间为 5~8 min, 降压时间为 10~15 min。以常压 (0.1 MPa), 相同温度与时间的菌悬液作为对照组。菌悬液经 HPCD 处理后, 在 4 °C 下 6000 r/min 离心 10 min 收集菌体备用。

#### 1.3.3 微生物计数

微生物计数采用平板菌落计数法。灭菌效果以菌落总数的对数值 (lg *N*) 表示, *N* 为大肠杆菌存活的菌落总数 (CFU/mL)。

#### 1.3.4 扫描电镜观察

菌体用 2.5% 戊二醛溶液固定, 贮存于 4 °C 冰箱内过夜, 之后用 0.1 M PBS 缓冲液 (pH 7.0) 漂洗, 1% 锇酸缓冲液固定, PBS 缓冲液冲洗, 40%、70%、90%、100% 乙醇分别进行梯度脱水处理, 每次 15 min。脱水后, 利用醋酸异戊酯置换乙醇, 采用临界点干燥法进行干燥, 金属喷涂后用扫描电镜观察, 观察倍数为 10000 倍。

#### 1.3.5 蛋白质样品制备

取 30 MPa 压强 HPCD 处理的湿菌体与常压对照组的湿菌体各 50 mg, 加入 10 倍体积细胞裂解液 (7M 尿素、2 M 硫脲、4% CHAPS、40 mM DTT、40 mM Tris

base、10  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂), 混匀后置于冰浴中超声(超声 3 s、停顿 5 s、功率 240 W) 破碎 10 min 至液体澄清, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 min, 取上清液即为蛋白质粗提液。上清液中加入 5 倍体积预冷的 10% TCA/丙酮溶液、10 mM DTT, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用冷丙酮、10 mM DTT 重悬后在 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min, 12000 r/min 离心 10 min, 如此重复清洗 3 次, 室温晾干残余丙酮。用裂解液重溶沉淀, 于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3.6 蛋白质溶解性测定

取菌体全蛋白质粗提液 1 mL, 置于 5 mL 带盖离心管中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下, 使用 10 MPa、20 MPa、30 MPa、40 MPa、50 MPa 的 HPCD 处理 30 min, 之后在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 min 去除不溶性沉淀, 测定上清液中蛋白质浓度。蛋白质浓度测定参照 Bradford 法, 使用牛血清白蛋白 (BSA) 绘制蛋白质浓度标准曲线。

### 1.3.7 双向电泳

将蛋白质样品与水化液 (7 M 尿素、2 M 硫脲、4% CHAPS、1% DTT、0.7% IPG buffer、0.002% 溴酚蓝) 充分混合, 总体积为 450  $\mu\text{L}$ , 蛋白质上样量为 360  $\mu\text{g}$ 。将 IPG 预制胶条 (pH 3~10、24 cm) 浸入水化液, 在 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下被动水化 12 h 后进行等点聚焦。IEF 程序设置为 50 V 快速升压除盐 4 h, 之后电压由 200 V 线性升至 8000 V, 最终共需 96 kWh 完成等电聚焦。取下 IPG 胶条, 平衡后转移至 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳后凝胶采用考马斯亮蓝法染色, 使用 ImageMaster 2D Platinum 7.0 软件分析胶图。将待鉴定胶点切下后酶解, 使用 Ultraflex MALDI TOF/TOF 质谱仪进行鉴定 (委托北京华大蛋白质研发中心进行)。质谱数据使用 Mascot 引擎搜索美国国家生物信息中心非冗余数据库 (NCBI nr), 寻找相匹配的蛋白质, 并查询其功能。

### 1.3.8 蛋白质二级结构测定

将 1.3.4 中经冷丙酮沉淀到的蛋白质复溶于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中, 添加蛋白酶抑制剂 10  $\mu\text{L}$ , 调整蛋白质浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 min, 上清液用圆二色谱 (Circular Dichroism, CD) 测定蛋白质二级结构含量。样品池厚 0.1 cm, 测定范围 195~260 nm。色谱数据使用 K2D3 软件分析, 预测其  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量<sup>[3]</sup>。

### 1.3.9 统计分析

试验数据用 SPSS 19.0 和 Excel 软件处理, 采用邓肯氏总重比较法 (Duncan's multiple-rang test) 进行差异显著性分析 ( $P < 0.05$ )。结果用均值  $\pm$  标准差的形式, 使用 Origin 8.0 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 HPCD 对大肠杆菌存活菌落数的影响

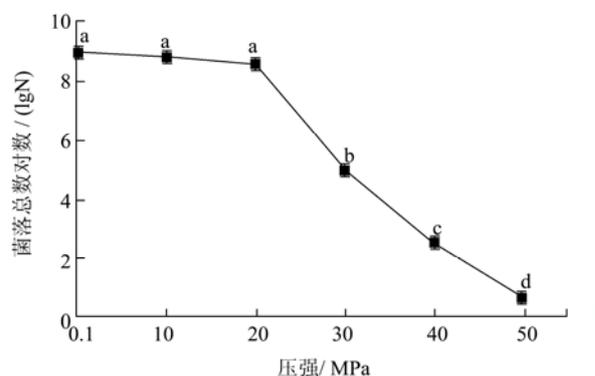


图1 不同压强高压二氧化碳 (37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min) 处理后大肠杆菌存活菌落总数

Fig.1 The total bacterial counts of *E. coli* after HPCD treatment with different pressures (37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min)

注: 图中不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

大肠杆菌经不同压强 HPCD 处理后的菌落计数见图 1, 存活菌落数随处理压强的增加而逐渐减少。经 10 MPa 与 20 MPa 的 HPCD 处理后, 与对照组 (0.1 MPa) 相比, 存活菌落数变化并不显著。而随着处理压强由 30 MPa 升至 50 MPa, 存活菌落数均有显著降低。在处理压强为 30 MPa 时, HPCD 对大肠杆菌的存活有显著影响, 但同时还有一定数量的菌株能够存活, 这部分菌株可能具有一定的 HPCD 耐受性, 研究此种状态下的菌株蛋白质组变化, 则有可能找到在 HPCD 胁迫状态下对细菌起保护作用的蛋白质。

### 2.2 HPCD 对大肠杆菌形态的影响

本试验对不同压强 HPCD 处理的大肠杆菌表观形态进行观察, 结果如图 1 所示。不同压强 HPCD 处理后的大肠杆菌与对照组相比, 形态没有明显差别, 未观察到细胞破裂现象。Ballestra 等人<sup>[4]</sup>用 35  $^{\circ}\text{C}$ 、5 MPa 的 HPCD 处理大肠杆菌 15 min, 发现细胞壁有变形的迹象, 可能伴随着细胞质和胞质膜流失。还观察到超过 25% 的细胞壁仍然是完整的, 但细胞的存活率只有 1%, 因此认为细胞壁变形是 HPCD 致死细胞的原因之一, 也可能存在其它致死机制。Hong 等人<sup>[5]</sup>使用 HPCD 处理植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 发现其细胞壁完整, 未发生变形, 认为细胞形态在 HPCD 胁迫下发生变化可能与微生物的种类有关。不同种类微生物的细胞壁与细胞膜结构不同, 刚性结构的细胞在 HPCD 处理后更能维持其细胞形态。Dillow 等人<sup>[6]</sup>研究表明, 大肠杆菌在 HPCD 处理后多数细胞壁保持

完整, HPCD 的杀菌机制并不在于细胞内压增加导致的破裂或者细胞壁脂质抽提造成的泄漏。

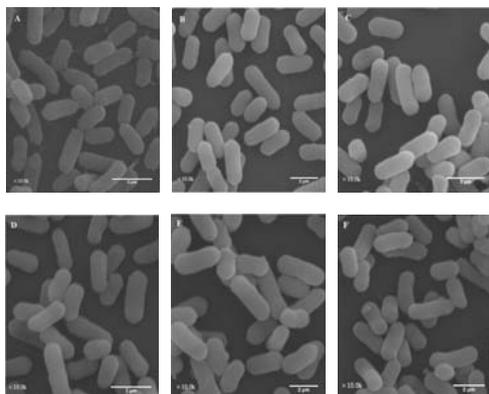


图2 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理对大肠杆菌菌体形态的影响

Fig.2 The effects of HPCD treatment at different pressures (37 °C, 30 min) on the morphology of *E. coli*

注: A-0.1 MPa ; B-10 MPa; C-20 MPa; D-30 MPa; E-40 MPa; F-50 MPa。

### 2.3 HPCD 对大肠杆菌蛋白质溶解性的影响

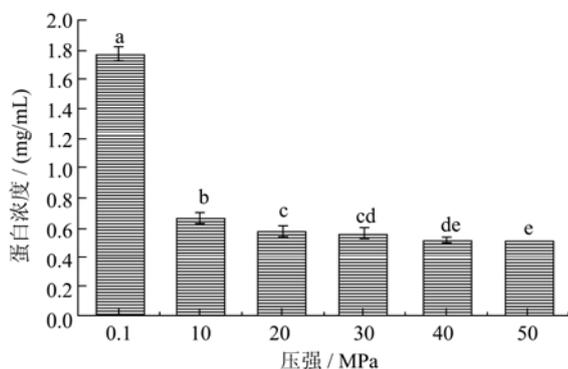


图3 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理后蛋白粗提液中的蛋白质浓度

Fig.3 The change of protein content in *E. coli* protein crude extracts after HPCD treatment with different pressures (37 °C, 30 min)

相比对照组, 经 10~20 MPa 的 HPCD 处理后蛋白粗提液中的蛋白质含量显著降低 (图 2)。不同压强 HPCD 处理组之间, 蛋白质含量随 HPCD 压强的增加而逐渐降低。经 20~50 MPa 的 HPCD 处理, 蛋白质含量显著低于 10 MPa 处理组; 经 40 MPa 的 HPCD 处理的蛋白质含量显著低于 20 MPa 处理组; 而当处理压强升至 50 MPa 时, 蛋白质含量显著低于 20 MPa 和 30 MPa 处理组。蛋白质溶解性的大小与其变性程度密切相关, 反映蛋白质分子在不同环境条件下的变化。蛋白质的溶解性受到诸如 pH 值、离子强度、温度、溶剂类型等的影响。压强也可以使蛋白质的天然构象

可逆性展开转变为变性结构, 使溶解性发生变化。随着压强升高, 蛋白质的溶解性逐渐降低。这可能是蛋白质内部的疏水基团暴露以及蛋白质之间的相互作用形成高分子量的聚集体, 蛋白质与水之间相互作用减弱。HPCD 对蛋白质溶解性的影响有别于高压处理, 压强改变蛋白质的溶解性是一方面, 此外还有 CO<sub>2</sub> 溶解在蛋白质提取液中形成高酸环境, 使蛋白质内部基团离解而产生分子内静电相互作用, 蛋白分子发生伸展、变性导致溶解性降低。

### 2.4 HPCD 对大肠杆菌蛋白质组成成分变化的影响

在对照组菌株的双向电泳图中分离到 747 个蛋白质点 (图 3A), 这些点集中分布在等电点为 4-7, 相对分子质量为 10~97 kDa 的范围内, 其中高丰度蛋白点分布于等电点为 5~7, 分子量为 19~38 kDa 之间。在 30 MPa 处理组菌株的双向电泳图中分离到 678 个蛋白质点 (图 3B), 相比对照组, 蛋白质点的数量明显减少。造成处理组分离到的蛋白质点比对照组少的原因可能是大肠杆菌经 HPCD 处理后存活率降低, 死亡的菌体细胞不合成蛋白质, 同时, HPCD 处理后菌体内部蛋白质的溶解性降低, 从而表现在双向电泳图谱上即处理组分离到的蛋白质点较对照组少。

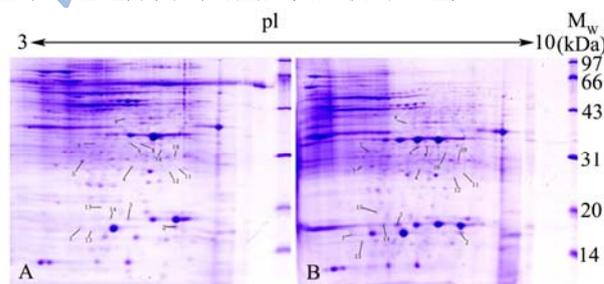


图4 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理后大肠杆菌蛋白质双向电泳图谱

Fig.4 The proteome map of *E. coli* treated by HPCD with different pressures (37 °C, 30 min)

注: A: 对照组菌株 (0.1 MPa 处理); B: 处理组菌株 (30 MPa 处理)。

经 ImageMaster 7.0 软件分析双向电泳图谱, 共发现 46 个差异最大的点, 其中新出现或消失的蛋白质点有 28 个, 差异在三倍以上的点有 18 个。选取其中具有代表性的 16 个蛋白质点进行质谱鉴定, 通过 Mascot 引擎检索 NCBI nr 数据库, 检索分值在 65 分以上视为可信结果 (P<0.05)。检索到的 HPCD 处理前后大肠杆菌差异表达的蛋白质数据如表 1 所示。这些差异蛋白质涉及到细胞骨架、新陈代谢、信号转换、运输与

翻译等功能。其中与细胞骨架相关的蛋白质有 1、4 号点；与代谢相关的蛋白质有 5、6、7、8、9、10、11、12、13 和 15 号点；与核酸相关的保护蛋白质有 2、3、14 和 16 号点。

#### 2.4.1 HPCD 对细胞组分相关蛋白质的影响

外膜蛋白是大肠杆菌细胞外膜上的一类重要蛋白质，它们具有  $\beta$ -桶状结构，使细胞外膜具有通透性，维持外膜结构的稳定，并且调节菌体内有关物质的合成。外膜蛋白存在稳定的折叠中间态，是革兰氏阴性菌在胁迫条件下正常存活的基础。HPCD 处理可能会对细胞膜造成破坏，影响细胞通透性，进而影响其正常存活，这一作用已在其他学者的研究中被证实<sup>[7]</sup>。外膜蛋白 OmpX 是具有 8 链反向平行的  $\beta$ -桶状结构的跨膜蛋白。通常认为 OmpX 所属的高度保守的蛋白质家族涉及促进细菌粘附与侵入哺乳动物细胞，以及对人补体系统的抵抗作用。虽然这类蛋白多数属于细菌毒力因子，但是大肠杆菌中 OmpX 蛋白的准确功能还不清楚。有研究<sup>[8]</sup>发现大肠杆菌中 OmpX 过量表达会降低 OmpF 和 OmpC 膜孔蛋白的表达水平。而 OmpF 与 OmpC 是大肠杆菌两个重要的外膜亲水性非特异孔蛋白，对于大肠杆菌的抗酸、抗渗透压、耐药等有重要作用。Bekhit 等人<sup>[9]</sup>研究证实 OmpC 与 OmpF 对大肠杆菌在极端酸性环境下的生存都有重要影响，单独

的 OmpC 或 OmpF 都可以支持大肠杆菌在酸性环境下存活，但是要达到最大的存活率则两种蛋白质都必须存在。本实验发现经过 HPCD 胁迫处理，OmpX 蛋白表达量显著下调，可能是 HPCD 的酸性环境诱导大肠杆菌表达 OmpF 和 OmpC 蛋白，而对 OmpX 蛋白的表达量产生影响。

#### 2.4.2 HPCD 对生物过程相关蛋白质的影响

试验发现 5、6、7、9、10 (11)、12、15 号蛋白质在 HPCD 处理后表达量下调或消失，表明 HPCD 处理使细胞内一些与代谢相关的酶发生变化，而影响细胞的正常生长代谢，使细胞死亡。其中，2,3,4,5-四氢吡啶-2-羧酸乙酯 N-琥珀酰转移酶参与天门冬氨酸途径的一系列反应<sup>[10]</sup>，此反应产生的代谢中间产物，如二氨基庚二酸，是细菌细胞壁生物合成的一个重要组成成分。因此，该酶的活性被抑制很可能会影响大肠杆菌在 HPCD 胁迫条件下的存活。

磷酸丝氨酸转氨酶<sup>[11]</sup>参与 L-丝氨酸的合成，L-丝氨酸是合成嘌呤、胸腺嘧啶、胆碱的前体物，L-丝氨酸的羟基经磷酸化作用后能衍生出具有重要生理功能的磷丝氨酸，磷丝氨酸是细胞膜磷脂的主要成分之一。HPCD 处理后，磷酸丝氨酸转氨酶表达量的下调最终可能影响磷丝氨酸的生物合成，进而影响细胞膜的通透性。

表 1 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理后大肠杆菌差异表达蛋白质质谱鉴定结果

Table 1 The proteins in *E. coli* that were expressed differentially after HPCD treatment with different pressures (37 °C, 30 min)

序号	蛋白质名称	NCBI nr 登录号	分子量 (Da)/pI 值	匹配 肽段	序列覆 盖率/%	蛋白质 评分
1	外膜蛋白 OmpX 晶体结构 A 链	gi 6435772	16350/5.04	11	70	133
2	Dps 蛋白 A 链	gi 33357153	18685/6.20	11	66	103
3	Dps 蛋白	gi 191166138	18711/5.72	21	88	211
4	外膜蛋白 OmpX	gi 293404114	14750/5.76	6	51	69
5	谷氨酸脱羧酶	gi 227888157	29775/4.98	8	41	58
6	2,3,4,5-四氢吡啶-2-羧酸乙酯 N-琥珀酰转移酶	gi 16128159	30045/5.56	19	67	176
7	3-氧酰基(酰基载体蛋白)还原酶 III	gi 15801208	33779/5.08	7	34	75
8	四氢吡啶 N-琥珀酰转移酶(dapD)	gi 145712	30192/5.57	13	41	109
9	磷酸丝氨酸转氨酶	gi 188496355	40014/5.36	9	26	65
10 (11)	尿苷磷酸化酶	gi 15804423	27304/5.71	11	45	70
12	谷氨酸脱羧酶同工酶	gi 307227971	16828/5.42	7	69	90
13	ATP 依赖伴侣蛋白 ClpB	gi 307226927	95769/5.48	15	59	92
14	Dps 蛋白	gi 15800564	18684/5.72	20	84	249
15	谷氨酸脱羧酶	gi 298382883	21067/5.00	6	47	69
16	Dps 蛋白晶体结构 A 链	gi 3660175	18757/5.72	16	77	142

注: pI, 等电点。

谷氨酸脱羧酶(GAD)催化 L-谷氨酸脱羧生成  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)和  $\text{CO}_2$ 。细菌中 GABA 的合成和

分泌是其抵抗极端酸性 pH 环境的主要机制<sup>[12]</sup>。大肠杆菌中 GAD 有两种同工酶  $\text{GAD}\alpha$  与  $\text{GAD}\beta$ ，编码这

两种酶的基因 *gadA* 与 *gadB*, 连同编码氨基酸转运载体的 *gadC* 基因一起组成 *gad* 系统, 是大肠杆菌抗酸系统中的主要部分。GAD 在 HPCD 胁迫下表达量下调, 谷氨酸结合质子生成 GABA 的效率降低, 细胞排出质子受阻, 无法起到抗酸作用。

试验同时发现 ClpB 蛋白经 HPCD 处理后表达量发生上调。ClpB 是具有 ATP 酶活性的分子伴侣蛋白, 在胁迫条件下, 起稳定蛋白质结构的作用, 防止蛋白质凝聚、变性, 并能修复变性的蛋白质。Ben-Zvi 等<sup>[13]</sup>认为 ClpB 会使蛋白聚集瓦解, 暴露出疏水位点, DnaK 与疏水位点结合, 而后在 GroEL 分子伴侣系统的协助下, DnaK 利用 ATP 提供的能量释放聚合物中多肽链间的错误折叠疏水链, 蛋白质重新折叠为天然状态。在 HPCD 胁迫条件下, 大肠杆菌细胞内产生大量不溶解的蛋白质, 而 ClpB 蛋白表达的上调则有利于这些变性蛋白质的修复。

### 2.4.3 HPCD 对分子功能相关蛋白质的影响

HPCD 处理促使与 DNA 结合相关的 Dps 蛋白质的表达上调。Dps 蛋白作为细菌中特有的一类能与铁离子结合的蛋白, 最早是在饥饿和氧化胁迫的大肠杆菌中发现, 它能保护细胞应对紫外线和  $\gamma$  射线, 铁和铜毒性, 热应力和酸性环境的威胁。Dps 蛋白可以与 DNA 直接结合, 将 DNA 包被形成高度致密有序的 Dps-DNA 共晶体, 保护 DNA 免受外界的伤害。HPCD 处理过程可能会破坏 Dps-DNA 复合物的有序性, 使 DNA 暴露在 HPCD 形成的酸性环境下而容易受到损伤。

### 2.5 HPCD 对大肠杆菌蛋白质二级结构的影响

响

不同压强 HPCD 处理的蛋白质溶液在远紫外区 (195~260 nm) 的 CD 色谱图如图 4 所示。由图可见, 对照组 (0.1 MPa) 菌体蛋白的二级结构主要以  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠为主, 在相应位置有特征性谱峰存在。不同

压强 HPCD 处理的蛋白质溶液  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量如表 2 所示。对照组溶液中蛋白质的  $\alpha$ -螺旋占 68.04%,  $\beta$ -折叠占 0.33%, 随着 HPCD 压强的增加溶液中蛋白质的  $\alpha$ -螺旋含量显著降低, 当 HPCD 压强增加至 50 MPa 时, 溶液中蛋白质的  $\alpha$ -螺旋含量降为 51.53%。相比对照组, 经 20 MPa 的 HPCD 处理  $\beta$ -折叠含量显著增加, 压强继续增加,  $\beta$ -折叠含量没有显著变化。这表明 HPCD 处理压强的变化会导致溶液中蛋白质的二级结构发生变化, 随处理压强的升高, 蛋白质的  $\alpha$ -螺旋含量下降,  $\beta$ -折叠含量上升。姜海荣等<sup>[14]</sup>研究 HPCD 对脂肪氧合酶分子构象的影响, CD 色谱图结果表明随 HPCD 压强增大, 脂肪氧合酶中  $\alpha$ -螺旋的含量依次降低。这与本研究中 HPCD 对蛋白质二级结构变化的影响一致, 表明 HPCD 会破坏蛋白质二级结构的有序性, 可能引发蛋白质的  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠的结构转换。 $\beta$ -折叠通常含有较多的非极性残基, 埋在蛋白质内部形成疏水核心, 而  $\alpha$ -螺旋一般是两性的, 亲水面位于蛋白质表面, 疏水测朝向蛋白质内部,  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠的结构转换, 使得疏水核心暴露、亲水面减少, 容易引起蛋白质分子间的聚集。这可能是前文中 HPCD 处理使蛋白质溶解性下降的原因。

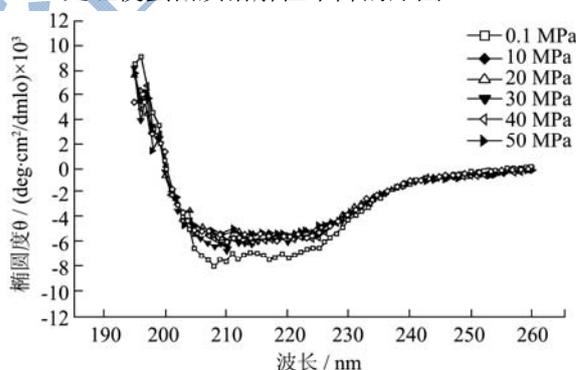


图 5 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理大肠杆菌菌体蛋白的圆二色谱图

Fig.5 The circular dichroism spectrum of *E. coli* proteins treated by HPCD with different pressures (37 °C, 30 min)

表 2 不同压强高压二氧化碳 (37 °C, 30 min) 处理后大肠杆菌菌体蛋白二级结构含量

Table 2 The fractions of secondary structures in *E. coli* proteins after treated by HPCD with different pressures (37 °C, 30 min)

	处理压强						P 值
	0.1 MPa	10 MPa	20 MPa	30 MPa	40 MPa	50 MPa	
$\alpha$ -螺旋/%	68.04±0.58 <sup>a</sup>	59.68±2.27 <sup>b</sup>	58.00±4.24 <sup>bc</sup>	54.47±3.74 <sup>bcd</sup>	52.89±4.00 <sup>cd</sup>	51.53±3.85 <sup>d</sup>	0.001
$\beta$ -折叠/%	0.33±0.07 <sup>c</sup>	1.41±0.64 <sup>bc</sup>	2.59±1.16 <sup>ab</sup>	3.45±1.14 <sup>a</sup>	3.85±1.40 <sup>a</sup>	4.08±1.37 <sup>a</sup>	0.006

注: 同一行不同的上标字母表示差异显著 (P<0.05)。

### 3 结论

经 10~50 MPa 的 HPCD 处理后, 大肠杆菌细胞未

发生破裂, 但大肠杆菌蛋白质溶解性、蛋白质表达量和二级结构则发生显著变化。采用 10 MPa 与 20 MPa 的 HPCD 处理大肠杆菌全蛋白提取液后, 其蛋白质溶

解性显著下降。HPCD 处理前后大肠杆菌蛋白质组中涉及细胞骨架、新陈代谢、信号转换、运输与翻译等生物学功能的蛋白质表达量发生显著变化。随着 HPCD 处理压强的增加,蛋白质的二级结构出现  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠的结构转换,使蛋白质的疏水性增强,溶解性降低。

### 参考文献

- [1] Spilimbergo S, Bertucco A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub> [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84(6): 627-638
- [2] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd A H, Spilimbergo S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(1): 1-28
- [3] Louis-Jeune C, Andrade-Navarro M A, Perez-Iratxeta C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2012, 80(2): 374-381
- [4] Ballestra P, Silva A, Cuq J L. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure [J]. *Journal of Food Science*. 1996, 61(4): 829-831
- [5] Hong S I, Pyun Y R. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide [J]. *Journal of Food Science*, 1999, 64(4): 728-733
- [6] Dillow A K, Dehghani F, Hrkach J S, et al. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1999, 96(18): 10344-10348
- [7] Liao H M, Zhang F S, Liao X J, et al. Analysis of *Escherichia coli* cell damage induced by HPCD using microscopies and fluorescent staining [J]. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 144(1): 169-176
- [8] Stoorvogel J, Bussel M, Klundert J, et al. Biology characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX) [J]. *Journal of Bacteriology*. 1991, 173(1): 161-167
- [9] Bekhit A, Fukamachi T, Saito H, et al. The role of OmpC and OmpF in acidic resistance in *Escherichia coli* [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, 34(3): 330-334
- [10] Jin J H, Choi K K, Jung U S, et al. Regulatory analysis of amino acid synthesis pathway in *Escherichia coli*: aspartate family [J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004(35): 694-706
- [11] Battula P, Dubnovitsky P, Papageorgiou A C. Structural basis of L-phosphoserine binding to *Bacillus alcalophilus* phosphoserine aminotransferase [J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2013, 69(5): 804-811
- [12] Peilong Lu, Dan Ma, Yuling Chen, et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia [J]. *Cell Research*. 2013, 23(5): 635-644
- [13] Ben-Zvi A P, Goloubinoff P. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones [J]. *Journal of Structural Biology*, 2001, 135(2): 84-93
- [14] 姜海荣,宋丽军,肖建,等.超临界二氧化碳条件下LOX酶分子的特性及其构象影响[J].石河子大学学报(自然科学版),2010,28(2):215-220  
JIANG Hairong, SONG Lijun, XIAO Jian, et al. Molecular properties and conformational changes of lipooxygenase under supercritical carbon dioxide [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2010, 28(2): 215-220