

研究报告



基于同位素标记相对和绝对定量技术研究耐铬(VI)菌株 CM01 的蛋白定量组学

刘媛¹ 顾芮嘉² 邱衍伦³ 李星龙¹ 李迎丽¹ 高洁莹¹ 肖虹^{*1}

1 重庆医科大学公共卫生与管理学院 重庆 400016

2 绵阳市涪城区疾病预防控制中心 四川 绵阳 621000

3 重庆市北碚区疾病预防控制中心 重庆 400700

摘要:【背景】六价铬[Cr(VI)]作为一种高毒性的重金属污染物,用微生物学方法还原 Cr(VI)既经济又环保。【目的】探究耐铬菌株 CM01 中与耐受或还原铬 Cr(VI)有关的蛋白或基因,从分子水平上阐述其耐铬 Cr(VI)机制。【方法】运用同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques, iTRAQ)分析耐铬菌株 CM01 在有无铬 Cr(VI)胁迫下的蛋白表达差异。运用 RT-qPCR 技术验证 4 种与代谢途径有关的上调蛋白的 mRNA 表达量。运用紫外分光光度计测定细胞表面疏水性。【结果】共鉴定到 2 570 个蛋白,其中存在显著差异的蛋白数为 646 个,上调蛋白数量 343 个,下调蛋白数量 303 个。CM01 中的 Fe/Mn 超氧化物歧化酶、甜菜碱醛脱氢酶、磷酸戊糖途径、磷酸肌醇代谢途径、氨基酸代谢共同参与了菌株对于外源性 Cr(VI)的响应机制。RT-qPCR 实验结果表明,与代谢途径有关的 4 种蛋白其基因转录水平和蛋白水平一致。对照组 CM01 的细胞表面疏水性高于实验组。【结论】初步探索了耐铬菌的 Cr(VI)响应机制,为利用微生物治理环境污染提供了理论支持和新的研究思路。

关键词: 同位素标记相对和绝对定量技术, 差异蛋白, 六价铬, 细菌, 耐受

Foundation item: Chongqing Natural Science Foundation (cstc2019jcyj-msxmX0177)

***Corresponding author:** E-mail: xhk20@163.com

Received: 05-04-2020; **Accepted:** 06-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0177)

***通信作者:** E-mail: xhk20@163.com

收稿日期: 2020-04-05; 接受日期: 2020-05-06; 网络首发日期: 2020-06-04

Quantitative proteomic in hexavalent chromium resistance CM01 by isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques (iTRAQ)

LIU Yuan¹ GU Rui-Jia² QIU Yan-Lun³ LI Xing-Long¹ LI Ying-Li¹ GAO Jie-Ying¹
XIAO Hong^{*1}

1 School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Mianyang Fucheng District Center for Disease Control and Prevention, Mianyang, Sichuan 621000, China

3 Chongqing Beibei District Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400700, China

Abstract: [Background] As a highly toxic heavy metal pollutant, the reduction of hexavalent chromium (Cr(VI)) by microbiological methods is not only economical but also environmentally friendly. [Objective] To explore the proteins or genes related the tolerance or reduction of Cr(VI) in chromium-resistant strain CM01, and to explain the tolerance mechanism of the strain at the molecular level. [Methods] The difference of protein expression in chromium-resistant strain CM01 under the Cr(VI) stress or not was analyzed by isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques (iTRAQ). The mRNA expression of 4 up-regulated proteins related to metabolic pathway was verified by RT-qPCR technique. The hydrophobicity of cell surface was determined by UV spectrophotometer. [Results] In this study, 2 570 proteins were identified and 646 were significantly different, of which 343 were up-regulated and 303 were down-regulated. Fe/Mn superoxide dismutase, betaine aldehyde dehydrogenase, pentose phosphate pathway, inositol phosphate pathway and amino acid metabolism in CM01 were involved in the response mechanism to exogenous Cr(VI). The results of RT-qPCR experiments showed that the gene transcription levels and protein level of the four proteins involved in metabolic pathways were consistent. The cell surface hydrophobicity of CM01 in the control group was higher than that in the experimental group. [Conclusion] Cr(VI) response mechanism of chromium-resistant bacteria was preliminarily explored in this study, which provides theoretical support and new research ideas for the use of microorganisms to control environmental pollution.

Keywords: iTRAQ technology, Different expression proteins, Hexavalent chromium, Bacteria, Resistance

随着我国现代工业的高速发展,环境中的人为重金属污染大大增加。重金属铬及其化合物被广泛应用于电镀、皮革、纺织染色等行业,这些生产都会排放出含铬废水或废渣,污染水体和土壤,还可以通过生物富集进入食物链对人体产生危害,严重威胁人类健康^[1]。铬在自然环境中主要以三价铬[Cr(III)]和六价铬[Cr(VI)]两种氧化态形式存在^[2]。由于Cr(VI)具有高毒性、致癌性、诱变性及较高的生物学利用性^[3],Cr(VI)污染已经成为被广泛关注的问题。对抗Cr(VI)污染最有效的方法是将Cr(VI)转化为Cr(III),Cr(III)溶解性较差,在生物学上不可用,因此毒性较小^[4]。目前将Cr(VI)还原为Cr(III)的方法主要有物理法、化学法、微生物

法,但理化方法操作成本高、效率低、不环保,并且在自然界中大多数过程是不可持续的^[5]。与理化方法相比,微生物法还原Cr(VI)是一种有效的替代方法,既经济又环保^[6]。

同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques, iTRAQ)是由美国应用生物系统公司研发的一种蛋白质组学体外同位素标记技术。该技术可同时对8个以内的样品进行相对定量分析,具有较高的精确性和重复性,并且过程简单,可同时比较和鉴定蛋白质^[7]。本研究用iTRAQ技术筛选耐铬菌株CM01在有/无Cr(VI)胁迫下的差异表达蛋白,对结果进行生物信息学分析,为阐明耐铬菌株耐受或

还原重金属 Cr(VI)的机制奠定基础。本研究有助于进一步了解微生物中与 Cr(VI)还原或耐受相关蛋白的表达, 为利用微生物治理环境中重金属污染提供帮助。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从重庆市某中小电镀厂聚集地区的铬(VI)污染环境^[8](河水和底泥)中分离得到耐铬菌 CM01, 37 °C、200 r/min 条件下, 用 LB 肉汤培养基^[9]培养至 OD_{600} 值为 1.0, 13 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。以 LB 肉汤中含 140 mg/L Cr(VI)培养的耐铬菌株 CM01 为实验组, 以无 Cr(VI)培养的耐铬菌株 CM01 为对照组, 每组 3 份样品, 分别编号为实验组 A1、A2、A3 和对照组 B1、B2、B3。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

BSA, 武汉楚诚正茂科技工程有限公司; DTT、Tris, 北京索莱宝科技有限公司; IAM, Aladdin 公司; PMSF, Xiya Reagent 公司; Trypsin, Promega 公司; Urea, Sigma 公司; iTRAQ-8 标试剂盒, AB SCIEX 公司; 细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、TB Green™ Premix ExTaq™ 试剂盒, TaKaRa 公司。

超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 真空冷冻干燥器, LaboGene 公司; 酶标仪, 上海永创医疗器械有限公司; TripleTOF™ 5600 Plus 质谱仪、AB SCIEX 公司; 高效液相色谱仪, Thermo Dinos 公司; 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 超微量分光光度计, 北京众力挽生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 上海超敏生物科技有限公司。

LB 肉汤培养基参照文献^[9]配制; 含 Cr(VI) LB 肉汤: 1 L LB 肉汤中加入 140 mg K_2CrO_4 。

1.3 iTRAQ 定量分析

收集的菌体样品送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行 iTRAQ 蛋白定量分析。

1.3.1 蛋白质提取

实验组 A1、A2、A3 与对照组 B1、B2、B3 在 37 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为 1.0, 13 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 向样品中加入蛋白裂解液, 混匀后冰上孵育 5 min, 加入终浓度为 10 mmol/L 的 DTT, 冰浴超声 15 min, 然后 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清于离心管中加入 4 倍体积的冷丙酮, -20 °C 静置过夜。13 000 r/min 离心 20 min 收集蛋白沉淀, 空气中晾干。加入 8 mol/L Urea/100 mmol/L 四乙基溴化铵 (pH 8.0) 溶液重新溶解蛋白, 加入 DTT, 56 °C 水浴 30 min 进行还原反应。随后加入 IAM 于暗处室温放置 30 min 进行烷基化反应。用 Bradford 法^[10]测定蛋白浓度, 用 SDS-PAGE 检测提取的蛋白质质量。

1.3.2 酶解、除盐及 iTRAQ 标记

取 100 μ g 获得的蛋白质用胰蛋白酶消化, 以 1:50 (质量比)的酶蛋白比添加胰蛋白酶, 在 37 °C 下进行 12–16 h 的消化反应。酶解后的肽段用 C18 柱脱盐, 真空冷冻干燥脱盐后的肽段。用 0.5 mol/L TEAB 溶解多肽, 根据 iTRAQ-8 标试剂盒说明书进行标记, 样本标记后混合, 将混合后的肽段运用高效液相系统对肽段样品进行分级分离。

1.3.3 液相色谱-质谱联用分析

将多肽样品溶解于 2%乙腈/0.1%甲酸中, 并使用与 Eksigent nanoLC 系统(SCIEX, USA)偶联的质谱仪进行分析。两个流动相是缓冲液 A (2%乙腈/0.1%甲酸/97.9% H_2O)和缓冲液 B (97.9%乙腈/0.1%甲酸/2% H_2O)。对于信息依赖性采集 (information-dependent acquisition, IDA), 以 250 ms 的离子累积时间进行一级质谱图的扫描, 并以 50 ms 的离子累积时间采集 30 个前体离子的二级质谱图。在 350–1 500 m/z 的范围内采集 MS1 光谱, 并且在 100–1 500 m/z 的范围内采集 MS2 光谱。

1.3.4 蛋白质定性及定量分析

对 MS/MS 质谱数据经过系列优化处理后与数据库进行相似性比对打分, 从而进行蛋白鉴定, 使用 Proteinpilot™ V4.5 搜索引擎。对于 Proteinpilot 鉴定到的蛋白, 认为 Unused score \geq 1.3 (即可信度水平在 95%以上), 每个蛋白至少包含一个 Unique 肽段的蛋白为可信蛋白。对于鉴定的肽段和蛋白质定量, 以 Conf \geq 95 过滤, 即可信度在 95%以上为可信肽段, 用于蛋白质定量。

1.3.5 差异蛋白及生物信息学分析

使用 Proteinpilot™ V4.5 搜索引擎实现蛋白质组 iTRAQ 定量, 根据差异倍数和 *Q*-value 筛选出差异蛋白。当差异倍数达到 1.5 倍及以上(即上调 \geq 1.5 和下调 \leq 0.67), 且经过显著性统计检验其 *Q*-value 值 \leq 0.01 时, 视为显著差异蛋白。利用 GO 数据库找到与生物学功能显著相关的差异蛋白, 利用 KEGG 数据库确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导。

1.4 mRNA 表达量测定(RT-qPCR)

根据 iTRAQ 蛋白定量结果, 筛选与代谢途径有关的上调蛋白, 分别对编码蛋白的基因进行实时荧光定量分析(RT-qPCR), 以验证 iTRAQ 蛋白定量结果的准确性。利用 Primer 5.0 设计目的基因序列的扩增引物序列, 如表 1 所示, 以 *gyrB* 基因的 mRNA 水平作为内参。将实验组与对照组的 CM01 在 37 °C、200 r/min 条件下培养至 *OD*₆₀₀ 值为 1.0 时, 用细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,

用超微量分光光度计测定总 RNA 浓度, 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 去除样品总 RNA 中的基因组 DNA 并进行逆转录。使用 TB Green™ Premix ExTaq™ 试剂盒进行 RT-qPCR。RT-qPCR 反应体系: 上、下游引物 (10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA (1 μg/mL) 0.8 μL, TB Green™ 5 μL, 加无酶水至反应管总体积为 10 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 95 °C 10 s, 39 个循环; 65 °C 5 s。数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算, 每个目的基因分别进行至少 3 次重复实验。

1.5 细胞表面疏水性实验

取 37 °C、200 r/min 培养过夜的实验组和对照组的 CM01 15 mL, 10 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 溶液洗涤 2 次, 每次加 5 mL PBS, 用 PBS 溶液重悬至 *OD*₆₀₀ 值为 0.5–0.8, 向 3 支试管中分别加 3 mL 细胞悬液和 1 mL 二甲苯, 涡旋 2 min。室温放置 1 h 后去除上层二甲苯溶液, 测下层水相的 *OD*₆₀₀ 值, 每管测 3 次。

$$\text{细胞表面疏水性} = (1 - OD_{\text{水相}}) / OD_{\text{初}}$$

2 结果与分析

2.1 耐铬菌株 CM01 的总蛋白提取与质控

分别定量提取了实验组与对照组的菌体总蛋白, 以 SDS-PAGE 电泳蛋白条带清晰均匀为质控标准, 确保所提取的蛋白质符合 iTRAQ 实验要求。SDS-PAGE 电泳结果如图 1 所示, 蛋白条带清晰无

表 1 目的基因的扩增引物序列及产物

Table 1 Primer pairs sequences of target genes

Primers name	Gene product	Primers sequence (5'→3')
fldA-F	Flavodoxin	GGCGGACGACAACCACTTCATC
fldA-R		TCGGCCAGGCTCAGCTCTTC
trxA-F	Thioredoxin	CACCTGACTGACAGCAGCTTCG
trxA-R		GCACGGCCACACCATTCAG
fliY_1-F	Sulfate starvation-induced protein 7	GAGTATCAGGGCGTGGGCATTC
fliY_1-R		GCGGCTGGGCGGATTGG
DX900_04235-F	Oxidoreductase	CGCCGAACGCCACCCATG
DX900_04235-R		CTTCTCCGCCGCCGAATC
gyrB-F	DNA gyrase subunit B	CATCTACTGCTTACCAACAACATTCC
gyrB-R		CCTTCTTGCTGTAGCCTTCCTTCTC

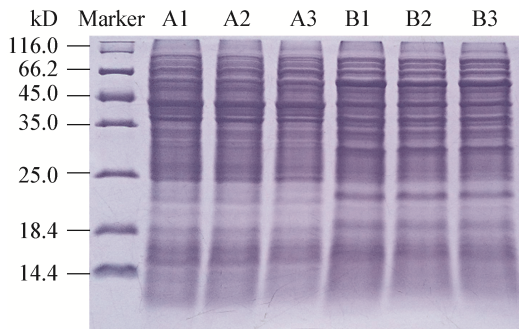


图1 实验组与对照组的 CM01 菌体总蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 1 SDS-PAGE of CM01 total protein in experimental group and control group

Note: Marker: Protein Marker sm0671 10–170 kD (26616); A1, A2, A3: Experimental group; B1, B2, B3: Control group.

降解, 蛋白总量可以满足 2 次以上实验(100 μg /次), 因此可以进行后续 iTRAQ 实验。

2.2 总蛋白的鉴定及定量分析

实验鉴定到的肽段长度分布如图 2 所示, 主要集中在 7–20 之间, 其中长度为 11 的肽段数目最多, 平均长度为 14.85, 在肽段长度合理范围内。同时表明蛋白酶解步骤中选用的蛋白酶适宜。

使用 ProteinPilot™ V4.5 搜索引擎实现蛋白质组 iTRAQ 定量, 结果表明实验组与对照组相比较时(A:B)相对定量到的蛋白质数为 2 570 个, 在相对定量结果中发现实验组(A:B)存在显著差异的蛋白数为 646 个, 其中显著性差异蛋白数目按照上调 ≥ 1.5 和下调 ≤ 0.67 、 Q -value 值 ≤ 0.01 进行筛选, 上调蛋白数量有 343 个, 下调蛋白数量有 303 个。由于差异蛋白数目较多, 按功能分类筛选出具有代表性的差异蛋白及其基因信息如表 2 所示。

2.3 总蛋白的功能分析

进行了常用的 GO、KEGG 分析, 以利用不同来源的数据库全面反映蛋白质的功能, 揭示蛋白质在各个生命活动中的生物学意义。共鉴定到 2 630 个蛋白质, 其中 GO 功能注释到 2 261 个蛋白质, KEGG 注释到的蛋白质为 1 333 个。

2.3.1 GO 注释

GO 是一个国际化的基因功能分类体系,

可以全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体, 分别描述基因的分子功能、细胞组分及参与的生物过程^[11]。为了能够更加清楚地分析差异蛋白质的功能, 针对上调和下调差异蛋白质进行独立的 GO 功能注释分析, 以 A:B 中 646 个差异蛋白质(343 个显著上调差异蛋白质和 303 个显著下调差异蛋白质)比对分析两者的 GO 注释结果, 如图 3 所示, 可以明显地看到上调和下调差异蛋白质在 GO 功能分类上有较大差异, 共涉及到 35 种功能。结果表明菌株 CM01 在有 Cr(VI)压力下与代谢过程、细胞过程、细胞成分、细胞、催化活性、结合等功能有关的重要蛋白显著上调以应对环境中不良因素对其生长的影响。其中, 分子功能中的结构分子活性只在上调差异蛋白质中存在, 差异蛋白均为核糖体蛋白质。

2.3.2 Pathway 代谢通路注释

在生物体内, 不同蛋白相互协调行使其生物学行为, 基于 Pathway 的分析有助于进一步了解其生物学功能。KEGG 是有关 Pathway 的主要公共数据库(Kanehisa, 2008), 通过 Pathway 分析能确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。本研究注释到 A:B 上调和下调差异蛋白质数目排名前 10 的 Pathway 功能如图 4 所示, 两者 Pathway 功能注释结果排名前 10 的功能中相同的有

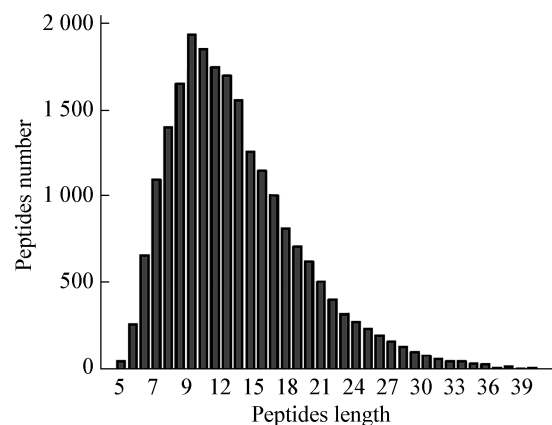


图2 所有肽段长度分布图

Figure 2 Length distribution of all peptides

表 2 耐铬菌株 CM01 在铬胁迫下差异表达蛋白及基因

Table 2 Differential expression of protein and gene of chromium tolerant strain CM01 under chromium stress

Categories		Accession	Description	Score
Stress response	Oxidoreductase	A0A3E2EKY9_SERMA	Alkene reductase GN=DX900_05080	19.60
		A0A3E2E933_SERMA	Superoxide dismutase GN=DX900_22340	10.89
		V5YVS1_SERMA	Aldehyde reductase GN=yqhD	10.11
		A0A2U9UJ2_SERMA	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase GN=metL	10.09
		A0A3E2EMI2_SERMA	GrxA family glutaredoxin GN=DX900_08005	10.02
		A0A3E2EK99_SERMA	Glutamate dehydrogenase GN=DX900_03790	6.54
		A0A2V4FLA4_SERMA	GMC family oxidoreductase GN=DMW43_26335	0.05
		A0A421HW45_SERMA	Superoxide dismutase [Cu-Zn] SodC2 GN=CLM68_00955	0.05
		A0A3E2ECI8_SERMA	Erythritol/L-threitol dehydrogenase GN=DX900_18205	5.28
		A0A1Q5W4C0_SERMA	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase GN=A8A12_14405	5.09
		A0A3E2E8L4_SERMA	L-threonine 3-dehydrogenase GN=tdh	4.83
		A0A3E2EJS3_SERMA	YciK family oxidoreductase GN=DX900_02875	4.50
		A0A3E2EL86_SERMA	Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=DX900_05955	4.40
		A0A3E2EIC1_SERMA	Catalase-peroxidase GN=katG	0.10
		A0A3E2EKT6_SERMA	Glutaredoxin GN=DX900_05095	3.54
		A0A3E2EKD4_SERMA	Oxidoreductase GN=DX900_04235	3.52
		A0A1C3HBA6_SERM	Glutathione-binding protein GsiB GN=gsiB	0.18
		A0A3E2EKK0_SERMA	Sorbose dehydrogenase family protein GN=DX900_03870	0.10
		A0A3E2EE85_SERMA	GMP reductase GN=guaC	3.06
		A0A3E2ENI8_SERMA	Flavodoxin GN=fldA	2.98
		A0A3E2EMJ7_SERMA	SDR family oxidoreductase GN=DX900_08215	0.27
		A0A2U9FTJ2_SERMA	Quinone oxidoreductase GN=B1A42_22115	0.38
		Energy metabolism	TCA cycle	A0A3Q0NWZ9_SERMA
A0A3Q0NUN1_SERMA	Pyruvate dehydrogenase GN=AAAY84_07035			0.39
Pyruvate metabolism	A0A3E2ENI5_SERMA		Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta GN=sucC	4.10
	A0A3E2ENG0_SERMA		Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha GN=sucD	2.94
	A0A3E2EAU2_SERMA		Bifunctional acyl-CoA synthetase/GNAT family N-acetyltransferase GN=DX900_18240	0.34
A0A3E2EIU0_SERMA	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase GN=DX900_00795		0.14	
A0A430PNL3_SERMA	2-(1,2-epoxy-1,2-dihydrophenyl)acetyl-CoA isomerase GN=paaB		0.16	
Others	A0A421HM43_SERMA		NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase GN=gabD	11.57
	A0A3E2EMT3_SERMA		NAD/NADP-dependent betaine aldehyde dehydrogenase GN=betB	3.02
PTS system	A0A0P0QFS9_SERMA		PTS mannose transporter subunit IID GN=manZ_2	0.19
	A0A3E2ENU5_SERMA	PTS N-acetyl glucosamine transporter subunit IABC GN=DX900_10270	0.23	
	A0A3E2E9Z9_SERMA	PTS mannitol transporter subunit IICBA GN=DX900_22390	0.27	
	A0A3E2EJB6_SERMA	PTS mannose transporter subunit IIAB GN=DX900_02055	0.29	
Inositol phosphate metabolism	A0A3Q0NL83_SERMA	Inositol dehydratase GN=iolE	20.73	
	A0A3S0B2U7_SERMA	Inositol 2-dehydrogenase GN=iolG	18.72	
	A0A430PUM9_SERMA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating) GN=mmsA	14.6	
	A0A3E2EB53_SERMA	Inositol-1-monophosphatase GN=suhB	11.91	
	A0A3E2E9T5_SERMA	5-dehydro-2-deoxygluconokinase GN=iolC	11.52	
	A0A379YC59_SERMA	3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase GN=iolD	11.08	
A0A3S0AMV0_SERMA	Gfo/Idh/MocA family oxidoreductase GN=C7M67_20780	7.87		
A0A3E2E9R7_SERMA	5-deoxy-glucuronate isomerase GN=iolB	3.80		

(待续)

			(续表 2)	
Pentose phosphate pathway	A0A3E2EMQ2_SERMA	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating GN=DX900_08265	0.02	
	A0A3E2EF08_SERMA	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain GN=pyrI	4.98	
	A0A3E2ELD7_SERMA	Gluconate 2-dehydrogenase subunit 3 family protein GN=DX900_05445	0.06	
	A0A3S0CLT2_SERMA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase GN=galU	3.83	
	A0A430NKC5_SERMA	Class 1 fructose-bisphosphatase GN=C7M68_02275	3.81	
	A0A221H7R7_SERMA	Ribose-phosphate pyrophosphokinase GN=prs	3.48	
	A0A430NDB7_SERMA	Aldolase GN=C7M67_12855	0.15	
	A0A3E2ECG9_SERMA	Transaldolase GN=tal	2.95	
	A0A3E2EEM2_SERMA	Deoxyribose-phosphate aldolase GN=deoC	0.38	
	A0A1C3HKL4_SERMA	ATP-dependent 6-phosphofructokinase GN=pfkA	0.38	
	A0A221DUR5_SERMA	S-adenosylmethionine synthase GN=metK	24.75	
	A0A3E2EMR8_SERMA	Methionine--tRNA ligase GN=metG	3.67	
	A0A3E2ENE8_SERMA	D-alanine--D-alanine ligase GN=ddl	2.87	
	A0A3E2EFD8_SERMA	TonB-dependent siderophore receptor GN=DX900_14200	27.53	
Amino acid metabolism	A0A2V4GZ58_SERMA	Aspartate-ammonia ligase GN=asnA	15.62	
	A0A3E2ENG6_SERMA	Adenosylhomocysteinase GN=DX900_09590	3.49	
	A0A3E2ECJ1_SERMA	Cysteine synthase GN=cysK	4.05	
	A0A0P0Q7X3_SERMA	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase GN=asd	6.93	
	A0A3E2EB03_SERMA	Serine hydroxymethyltransferase GN=glyA	5.21	
	Others	A0A421HWQ6_SERMA	Diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase GN=CLM68_01950	18.17
		A0A3E2EBZ9_SERMA	Acetate kinase GN=ackA	9.77
		A0A3E2EC08_SERMA	Porin OmpC GN=ompC	0.04
		A0A3E2EF80_SERMA	Sulfate adenylyltransferase subunit 2 GN=cysD	5.65
		A0A0P0QD16_SERMA	Acyolphosphatase GN=AR325_11075	0.06
		A0A3E2E8C4_SERMA	Glutamine synthetase GN=DX900_22850	4.68
		A0A3E2EA90_SERMA	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase GN=dapD	4.63
		A0A3E2EEA7_SERMA	Peptidoglycan D,D-transpeptidaseFtsI GN=ftsI	4.09
		A0A3S0CAT6_SERMA	Nitrate reductase subunit beta GN=narH	3.81
A0A3E2EPG8_SERMA		Aspartate aminotransferase family protein GN=DX900_04065	3.69	
A0A3E2ENV6_SERMA		Lon protease GN=lon	3.00	

4 种, 分别是代谢通路、次级代谢产物的合成、微生物在不同环境中的代谢机制和 ABC 转运体。相比较上调差异蛋白质的注释结果, 微生物在不同环境中的代谢机制在下调差异蛋白质注释结果中的比例明显上升, 说明该功能对于 CM01 在抵御不良环境因素中起到了重要的作用。

2.4 差异蛋白的富集分析

2.4.1 GO 富集分析

通过 GO 显著性分析能确定差异蛋白行使的主要生物学功能, A:B 差异蛋白生物学过程显著富集分析结果如表 3 所示, 其中排名前五的是细胞酮代谢过程、乙酰辅酶 A 代谢过程、有机酸代谢、羧酸代谢和酮酸代谢过程, 此富集分析与 GO 注释中参与代谢过程的蛋白显著上调结果一致。A:B 差异蛋白分子功能显著富集分析结果如表 4 所示, 主要富集在连接酶的活性、核糖体结构组成等功能,

此结果与 GO 注释中注释到与结合、结构分子活性功能有关的蛋白质表达上调相一致。A:B 差异蛋白细胞组分显著富集分析结果如表 5 所示, 差异蛋白主要富集在细胞内成分、胞质成分、细胞器、细胞质中。

2.4.2 Pathway 富集分析

通过 Pathway 显著性富集能确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。图 5 为比较组 A:B 差异蛋白质 Pathway 富集分析显著性统计图, 反映了不同功能通路下的显著性差异蛋白质分布。最显著的差异蛋白主要集中在 24 个通路当中, 通路功能主要集中在氨基酸代谢(如蛋氨酸、赖氨酸、谷氨酸等)、能量代谢(如 TCA 循环、丙酮酸代谢等)、细菌分泌系统、肌醇代谢等。其中参与磷酸肌醇代谢途径的蛋白均上调, 参与苯乙烯聚合物降解途径的蛋白均下调。

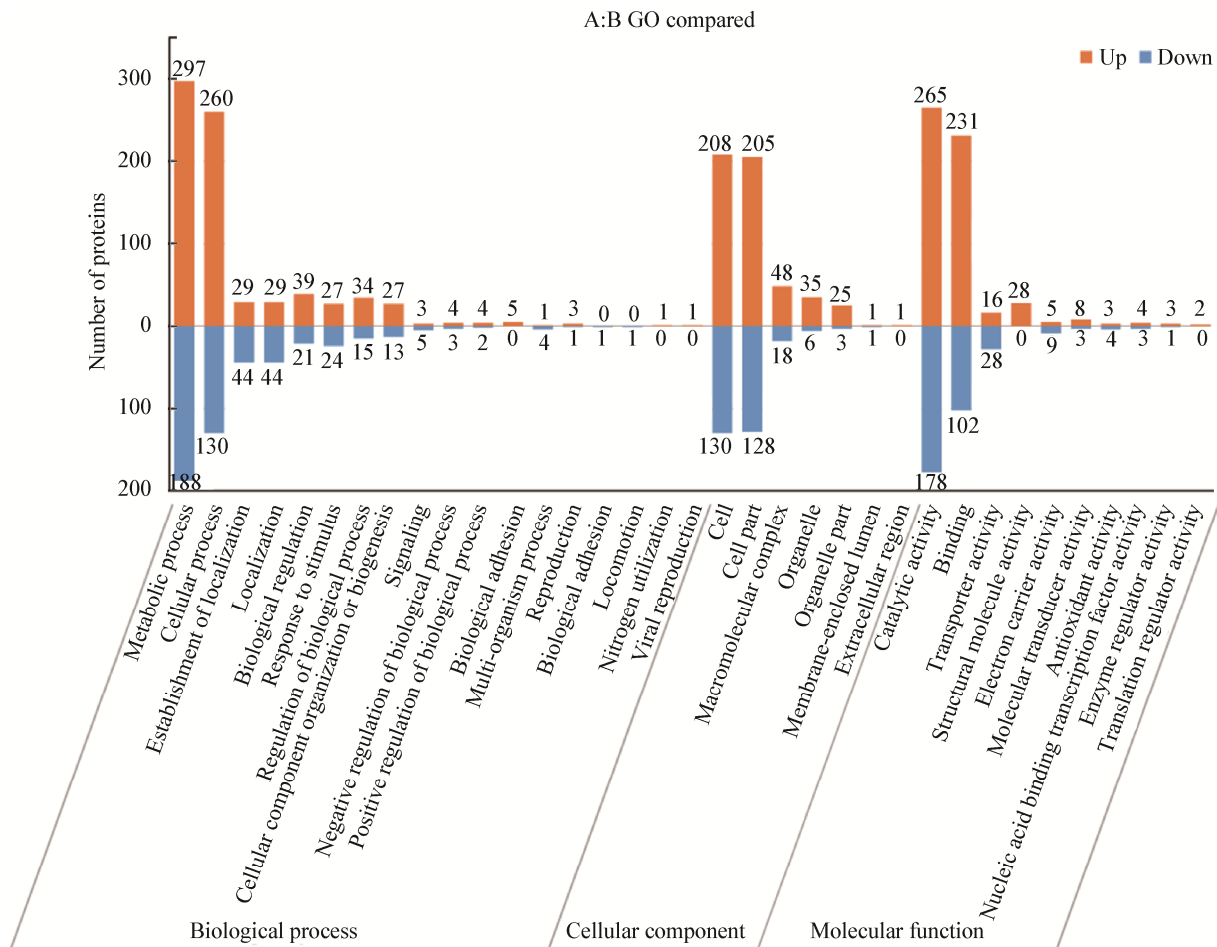


图3 差异蛋白质 GO 功能注释结果统计柱状图

Figure 3 Statistical histogram of annotation results of differential protein GO function

2.5 mRNA 表达水平测定

通过 RT-qPCR 进一步验证 iTRAQ 蛋白定量结果的准确性, 在表 2 中筛选出参与代谢途径的 4 种蛋白, 根据 iTRAQ 蛋白定量的评分高低分别是: 硫酸盐饥饿诱导蛋白(gene: *fliY_1*)、氧化还原蛋白(gene: *DX900-04235*)、黄素氧还蛋白(gene: *fldA*)、硫氧还蛋白(gene: *trxA*)。测定编码 4 种蛋白的基因 mRNA 表达水平如图 6 所示, 实验组目的基因 mRNA 的表达量与对照组的表达量有显著性差异($P < 0.05$), 而且 4 种基因 mRNA 的表达水平高低与 iTRAQ 蛋白定量结果评分一致。

2.6 细胞表面疏水性

实验组和对照组 CM01 细胞表面疏水性的测定结果如图 7 所示, 在有 Cr(VI)胁迫下 CM01 的细胞

表面疏水性为 69.1%, 无 Cr(VI)胁迫下 CM01 的细胞表面疏水性为 34.6%, 实验组 CM01 的细胞表面疏水性与对照组 CM01 的细胞表面疏水性有显著差异($P < 0.001$)。

3 讨论

近年来, 国内外报道的利用微生物去除环境中 Cr(VI)研究很多, 这些研究局限于对菌株的分离、筛选、鉴定和去除污染物的研究, 很少从生物大分子的角度深入探讨耐铬菌株对 Cr(VI)的耐受及还原机制。本研究首次运用 iTRAQ 技术分析有无 Cr(VI)压力下耐铬菌株 CM01 的蛋白差异表达, 可以进一步从基因水平探究与铬代谢相关的蛋白或基因。为了研究耐铬菌株 CM01 的耐受或还原 Cr(VI)的机制, 采用 iTRAQ 技术进行蛋白质组学分

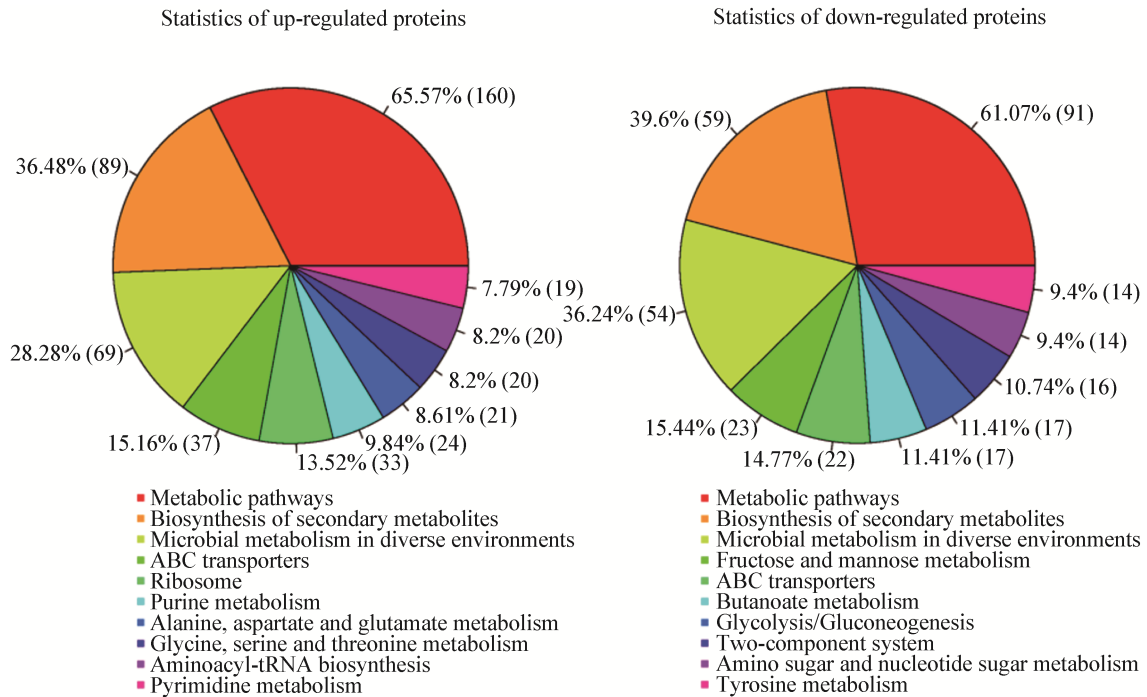


图 4 比较组 A:B 上调和下调差异蛋白质 Pathway 代谢通路注释结果统计图

Figure 4 Comparison group A:B up-regulated and down-regulated differential protein pathway annotation results statistical chart

注: 括号中标示的为每个功能下的蛋白质数目。

Note: The number of proteins under each function is indicated in brackets.

表 3 比较组 A:B 差异蛋白生物学过程显著富集分析结果(前五)

Table 3 Analysis results of significant enrichment of biological process of A:B differential protein in comparison group (top 5)

Gene Ontology term	Cluster frequency	Protein frequency of use	P value
Cellular ketone metabolic process	118 out of 540 genes, 21.9%	299 out of 2 070 genes, 14.4%	1.75×10^{-3}
Acetyl-CoA metabolic process	21 out of 540 genes, 3.9%	28 out of 2 070 genes, 1.4%	4.53×10^{-5}
Organic acid metabolic process	114 out of 540 genes, 21.1%	293 out of 2 070 genes, 14.2%	8.39×10^{-5}
Carboxylic acid metabolic process	113 out of 540 genes, 20.9%	290 out of 2 070 genes, 14.0%	8.81×10^{-5}
Oxoacid metabolic process	113 out of 540 genes, 20.9%	290 out of 2 070 genes, 14.0%	1.38×10^{-5}

注: Gene Ontology term 为 GO 条目. Cluster frequency 为注释到该条目的差异蛋白与注释到所有 GO 条目的差异蛋白的数量和比值. Protein frequency of use 为注释到该条目的所有蛋白与注释到所有 GO 条目的所有蛋白的数量和比值. P value 为通过超几何检验计算得到 P value 值. 下同.

Note: Gene Ontology term is a go entry. Cluster frequency is the number and ratio of differential proteins annotated to this entry and annotated to all go entries. Protein frequency of use is the number and ratio of all proteins annotated to this entry and all proteins annotated to all go entries. P value is the P value calculated by hypergeometric test. The same below.

表 4 比较组 A:B 差异蛋白分子功能显著富集分析结果(前五)

Table 4 Analysis results of significant enrichment of molecular function of A:B differential protein in comparison group (top 5)

Gene Ontology term	Cluster frequency	Protein frequency of use	P value
Ligase activity	42 out of 532 genes, 7.9%	90 out of 2 039 genes, 4.4%	1.36×10^{-5}
Structural constituent of ribosome	28 out of 532 genes, 5.3%	52 out of 2 039 genes, 2.6%	1.48×10^{-5}
Aminoacyl-tRNA ligase activity	17 out of 532 genes, 3.2%	27 out of 2 039 genes, 1.3%	5.40×10^{-5}
Ligase activity, forming carbon-oxygen bonds	17 out of 532 genes, 3.2%	27 out of 2 039 genes, 1.3%	5.40×10^{-5}
Ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds	17 out of 532 genes, 3.2%	27 out of 2 039 genes, 1.3%	5.40×10^{-5}

表 5 比较组 A:B 差异蛋白细胞组分显著富集分析结果(前五)

Table 5 Analysis results of significant enrichment of cellular component of A:B differential protein in comparison group (top 5)

Gene Ontology term	Cluster frequency	Protein frequency of use	P value
Intracellular part	211 out of 338 genes, 62.4%	640 out of 1 206 genes, 53.1%	2.95×10^{-5}
Cytoplasmic part	90 out of 338 genes, 26.6%	231 out of 1 206 genes, 19.2%	3.40×10^{-5}
Non-membrane-bounded organelle	34 out of 338 genes, 10.1%	68 out of 1 206 genes, 5.6%	6.36×10^{-5}
Intracellular non-membrane-bounded organelle	34 out of 338 genes, 10.1%	68 out of 1 206 genes, 5.6%	6.36×10^{-5}
Cytoplasm	200 out of 338 genes, 59.2%	608 out of 1 206 genes, 50.4%	9.24×10^{-5}

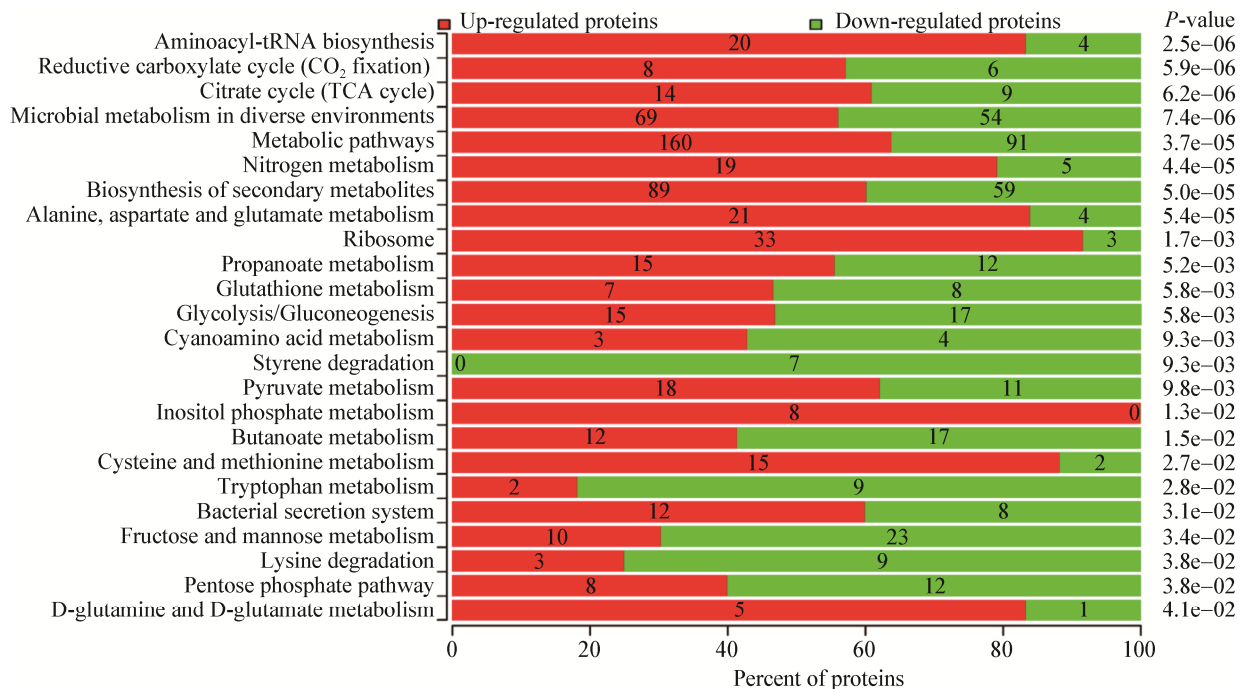


图 5 比较组 A:B 差异蛋白 Pathway 富集分析显著性统计图

Figure 5 Statistical map of significance of pathway enrichment analysis of A:B differential protein in comparison group

注: 图中柱子左侧为各个功能通路名称, 右侧代表是此通路富集显著性水平 P 值, 柱子红色/绿色区域分别是此通路中所包含的鉴定到的上调和下调蛋白质的百分比, 柱子上的数字代表相应差异蛋白质数目。

Note: In the figure, the left side of the column is the name of each functional pathway, and the right side represents the significance level P -value of enrichment of this pathway. The red and green area of the column is the percentage of up-regulated and down-regulated proteins identified in this pathway, and the number on the column represents the corresponding differential protein number.

析, 比较耐铬菌株 CM01 在有无 Cr(VI) 胁迫下的蛋白表达差异, 并且运用 RT-qPCR 技术对涉及代谢途径的 4 种蛋白(硫酸盐饥饿诱导蛋白、氧化还原蛋白、黄素氧还蛋白、硫氧还蛋白)进行转录水平

的验证, RT-qPCR 结果与 iTRAQ 蛋白定量结果一致。通过对这些差异蛋白进行功能注释、富集分析, 发现应激反应、能量代谢、磷酸肌醇代谢、氨基酸代谢等通路与 CM01 适应 Cr(VI) 压力有关。

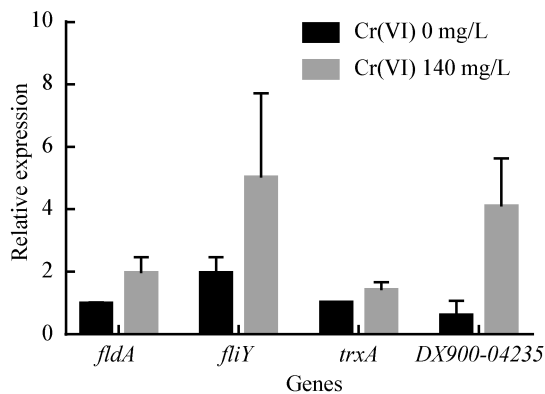


图6 实验组和对照组 CM01 中 4 个目的基因的表达量
Figure 6 Expression of four target genes in CM01 of experimental group and control group

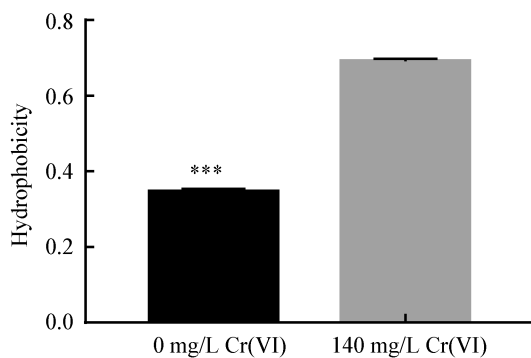


图7 实验组和对照组 CM01 细胞表面疏水性的测定
Figure 7 Determination of hydrophobicity of CM01 cell surface in experimental group and control group

3.1 应激反应

本研究发现许多与氧化还原、普遍应激相关的蛋白出现不同程度的上调或下调, 如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、氧化还原酶及应激蛋白。SOD 作用于在细胞内产生的对生物系统有毒的自由基, 从而增强细菌在不良环境下的耐受性和适应性。研究表明, 微生物中 SOD 的表达与重金属胁迫有关^[12]。本研究结果中 Mn/Fe SOD 上调明显, 可能是 CM01 对 Cr(VI) 产生的抗氧化性作用, 以适应有 Cr(VI) 环境。此外, 我们选取黄素氧还蛋白、硫氧还蛋白等参与氧化还原反应的蛋白进行 RT-qPCR 实验, 编码这些蛋白的基因转录水平和 iTRAQ 蛋白定量结果一致, 还有许多

家族氧化还原蛋白如 Gfo/Idh/MocA 家族氧化还原酶、Ycik 家族氧化还原酶等表达明显上调, 这些蛋白可能都参与了 CM01 对 Cr(VI) 环境的适应性。

3.2 能量代谢

CM01 关于能量代谢中有 NAD(P)⁺ 依赖的琥珀酸半醛脱氢酶 GabD、NAD(P)⁺ 依赖的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)上调明显, 其中 BADH 在大多数有甜菜碱合成能力的细菌中存在, 是催化甜菜碱合成必不可少的关键酶, 而甜菜碱被认为是最好的渗透调节剂, 在细菌和抗高盐高等植物中广泛存在, 除了参与细胞的渗透调节外, 还具有在渗透胁迫条件下稳定生物大分子结构和功能的作用, 可以提高植物和细菌的抗逆能力^[13]。在 Cr(VI) 压力下, CM01 中 BADH 的表达上调, 可能是由于铬酸盐的胁迫使得 CM01 中 BADH 上调合成更多甜菜碱来协同应对 Cr(VI) 环境。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH)是磷酸戊糖途径中的关键酶, 在 CM01 中可以看到这两种蛋白显著下调, 表明 Cr(VI) 环境抑制了磷酸戊糖途径分解葡萄糖这一过程, 且 CM01 中涉及葡萄糖磷酸转移酶系统(PTS 系统)的蛋白均出现下调, 也侧面反映了 CM01 在 Cr(VI) 环境中碳水化合物的代谢受到抑制。菌株的这种节能生存模式是一种内在相对平衡的生理状态, 以应对包括重金属在内的不良环境压力^[14]。

3.3 磷酸肌醇代谢

磷酸肌醇的分解代谢可能涉及到氧化、磷酸化等生物学过程, 还能进一步氧化产生糖酵解途径中的中间产物磷酸二羟基丙酮, 进一步被代谢为乙酰辅酶 A^[15]。肌醇能够通过参与细胞渗透的调节、细胞膜的合成、细胞信号的传导、生长素的积累和利用等过程以应对胁迫, 尤其对于生物应对逆境胁迫发挥着重要作用^[16]。在本研究结果中可以看到参与磷酸肌醇代谢途径的 8 个蛋白均出现上调, 其中肌醇合成的关键酶肌醇单磷酸酶, 以及参与肌醇逐步代谢的 IoI 酶都较高表达, 表明耐铬菌株 CM01 自身具有完整的肌醇代谢途径系

统。已报道有些微生物能以肌醇为唯一碳源维持自身生长,如枯草芽孢杆菌、隐球菌^[17],而先前讨论中可以看出在 CM01 中磷酸戊糖途径,PTS 系统等有关碳水化合物代谢通路的蛋白在 Cr(VI)胁迫时受到了抑制,而有关肌醇代谢途径中的蛋白均上调,我们猜测 CM01 的 Cr(VI)代谢可能会通过磷酸肌醇代谢途径,一方面通过氧化、磷酸化过程维持自身正常生长,另一方面可以通过肌醇的生物学功能应对高 Cr(VI)胁迫,有关磷酸肌醇途径的抗性机制还有待进一步深入研究。

3.4 氨基酸代谢

在上调的有关氨基酸代谢的蛋白中,主要涉及到 S-腺苷甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸等。其中评分最高的 S-腺苷甲硫氨酸合酶(SAM 合酶)可以催化甲硫氨酸和 ATP 生成 S-腺苷甲硫氨酸(SAM),有报道 SAM 对于在大豆的氧化应激中具有保护作用^[18]。甜菜碱的合成也要依赖 SAM 作为甲基供体,这也进一步说明在高 Cr(VI)环境下,CM01 还通过合成更多的甜菜碱应对金属应激。半胱氨酸是蛋氨酸和谷胱甘肽合成所必需的,被认为是抗氧化防御和金属螯合的主要代谢产物,具有巯基基团,可以优先与重金属结合^[19]。本研究结果中参与半胱氨酸的蛋白明显上调,可能是 CM01 通过产生更多与 Cr(VI)结合的蛋白,从而保护细胞免受 Cr(VI)毒性。甲硫氨酸、芳香族氨基酸、苯丙氨酸、缬氨酸等都是疏水性氨基酸,在 CM01 中合成这些疏水性氨基酸的酶表达量上调。通过细胞表面疏水性实验同样再次验证了这一结果,在有 Cr(VI)胁迫下 CM01 的细胞表面疏水性增大,疏水性氨基酸在菌体表面表达可以形成很强的疏水区域,这可能是 CM01 防止 Cr(VI)暴露导致细胞损害的又一策略。

4 结论

通过 iTRAQ 蛋白定量分析,发现耐铬菌株 CM01 中 SAM 合成酶、肌醇代谢的相关蛋白、Fe/Mn 超氧化物歧化酶、甜菜碱醛脱氢酶等关键酶可能都

协同参与了高 Cr(VI)的耐受与还原。综合分析,CM01 菌株对于 Cr(VI)耐受的潜在机制可以归为以下几类:(1) Fe/Mn SOD 破坏 Cr(VI)在细胞内产生的自由基,从而增强了菌株在高 Cr(VI)环境下的适应性。(2) CM01 中通过 BADH 上调合成更多甜菜碱来协同应对高 Cr(VI)环境。(3) CM01 通过抑制磷酸戊糖途径减少葡萄糖的消耗这一种节能生存模式来应对不良生存环境。(4) 磷酸肌醇代谢途径在 CM01 抗 Cr(VI)机制中可能发挥着重要作用。(5) 甲硫氨酸及疏水性氨基酸的高度合成是 CM01 防止 Cr(VI)暴露导致细胞损伤的又一重要策略。

REFERENCES

- [1] Jobby R, Jha P, Yadav AK, et al. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: a comprehensive review[J]. Chemosphere, 2018, 207: 255-266
- [2] Zhu HF. Prevention and control of hexavalent chromium pollution in electroplating industry[J]. Shanxi Metallurgy, 2018, 41(4): 59-61 (in Chinese)
祝洪芬. 电镀行业六价铬污染的防治[J]. 山西冶金, 2018, 41(4): 59-61
- [3] Xu WT, Zhang ZW, Yuan WY, et al. Treatment of Cr(VI)-contaminated soil through mechanochemical reduction with ferrous sulfate[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(6): 1759-1765 (in Chinese)
许维通, 张紫薇, 苑文仪, 等. 基于硫酸亚铁的机械化学还原法处理六价铬污染土壤[J]. 环境工程学报, 2018, 12(6): 1759-1765
- [4] Sarangi A, Krishnan C. Detoxification of hexavalent chromium by *Leucobacter* sp. uses a reductase with specificity for dihydroliipoamide[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(2): 175-183
- [5] Bhattacharya A, Gupta A, Kaur A, et al. Alleviation of hexavalent chromium by using microorganisms: insight into the strategies and complications[J]. Water Science & Technology, 2019, 79(3): 411-424
- [6] Gao J. Application of microorganism in sludge harmless treatment[J]. Journal of Green Science and Technology, 2018(10): 117-118 (in Chinese)
高杰. 微生物在污泥无害化处理中的应用[J]. 绿色科技, 2018(10): 117-118
- [7] Aggarwal S, Yadav AK. Dissecting the iTRAQ data analysis[A]//Jung K. Statistical Analysis in Proteomics[M]. New York: Humana Press, 2016: 277-291
- [8] Jia Y, Bai QH, Xiao H. Investigation of the status of

- chromium pollution at an electroplating industrial area in Chongqing[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2014, 41(6): 978-980,983 (in Chinese)
- 贾燕, 白群华, 肖虹. 重庆市某电镀厂聚集区域铬污染状况调查[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(6): 978-980,983
- [9] Wu Y, Deng P, Jia Y, et al. Identification of *Alcaligenes faecalis* and its characteristics of tolerating for hexavalent chromium[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(7): 3545-3550 (in Chinese)
- 吴颖, 邓鹏, 贾燕, 等. 一株耐铬产碱菌的鉴定及其铬(VI)解毒特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(7): 3545-3550
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254
- [11] The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 43(D1): D1049-D1056
- [12] Borsetti F, Tremaroli V, Michelacci F, et al. Tellurite effects on *Rhodobacter capsulatus* cell viability and superoxide dismutase activity under oxidative stress conditions[J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156(7): 807-813
- [13] Cui J, Li BS, Shi SZ, et al. Advance on research for gene engineering of plant betaine aldehyde dehydrogenase[J]. *China Beet & Sugar*, 2006(1): 40-44 (in Chinese)
- 崔杰, 李滨胜, 史淑芝, 等. 植物甜菜碱醛脱氢酶基因工程研究进展[J]. *中国甜菜糖业*, 2006(1): 40-44
- [14] Zhai QX, Xiao Y, Zhao JX, et al. Identification of key proteins and pathways in cadmium tolerance of *Lactobacillus plantarum* strains by proteomic analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1182
- [15] Krings E, Krumbach K, Bathe B, et al. Characterization of *myo*-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(23): 8054-8061
- [16] Yang N. Expression and function of inositol metabolism key enzyme gene in Poplar[D]. Yantai: Master's Thesis of Ludong University, 2017 (in Chinese)
- 杨楠. 杨树肌醇代谢关键酶基因的表达及功能研究[D]. 烟台: 鲁东大学硕士学位论文, 2017
- [17] Morinaga T, Ashida H, Yoshida KI. Identification of two *scyllo*-inositol dehydrogenases in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(5): 1538-1546
- [18] Noriega GO, Balestrasse KB, Battle A, et al. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of δ -aminolevulinic acid[J]. *Biometals*, 2007, 20(6): 841-851
- [19] Gan Y, Xiao Y, Zhai QX, et al. Analysis of cadmium adsorption and tolerance characteristics of *Lactobacillus plantarum* by iTRAQ proteomics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(4): 1-15 (in Chinese)
- 甘雨, 肖越, 翟齐啸, 等. 基于 iTRAQ 蛋白组学的植物乳杆菌镉吸附及耐受特征分析[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(4): 1-15