

分类号.....

密级.....

UDC .....

编号.....

中南大學

CENTRAL SOUTH UNIVERSITY

# 硕士学位论文

论文题目 嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达  
图谱的构建

学科、专业 生物工程

学院（系、所） 资源加工与生物工程学院

研究生姓名 李庆华

导师姓名及 胡岳华教授

专业技术职务 贺治国副教授

2008 年 5 月



分类号 VDC \_\_\_\_\_

密级 \_\_\_\_\_

## 硕士学位论文

### 嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白 表达图谱的构建

### Research on the cell wall related proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

姓名：                李庆华  
学科专业：            生物工程  
学院（系、所）：    资源加工与生物工程学院  
导  师  ：            胡岳华 教授, 贺治国 副教授

论文答辩日期 \_\_\_\_\_

答辩委员会主席 \_\_\_\_\_

中 南 大 学  
2008 年 5 月



## 摘 要

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) ,是目前使用最广泛, 研究最深入的浸矿微生物。细菌吸附至矿物表面无论对于细菌在自然环境中的生存, 还是对于生物浸出过程都具有十分重要的意义。本文通过构建嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达图谱, 从蛋白质组学角度探讨浸矿微生物表面结构, 为微生物与矿物表面的吸附机理研究提供一些依据。

本论文研究中, 提取了嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白, 采用液相色谱—串联质谱技术先对酶解后的蛋白进行分离, 分离后的肽段直接进入质谱仪离子源进行一级和二级质谱的分析。由于可以得到的关于 *A. ferrooxidans* 的肽质量指纹图谱 (PMF) 数据库还不健全, 我们利用生物信息学技术构建了用于质谱蛋白质组学分析的 *A. ferrooxidans* 的 PMF 数据库。将得到 245 个肽质量指纹图谱用 Mascot 软件进行数据库搜寻得到蛋白相关信息, 然后对每一个蛋白的输出信号及亚细胞定位进行预测, 目前共得到 97 个目标蛋白。这些已鉴定的蛋白中 42.3% 有 Sec-type 信号肽, 7.2% 具有双精氨酸转运信号肽 (Tat), 18.6% 的蛋白具有脂蛋白信号肽 (Lipo), 21.6% 的蛋白为非经典分泌蛋白 (non-classically secreted proteins), 根据亚细胞定位预测还有 19.6% 的蛋白也被认为是目标蛋白。按其功能分类, 43.3% 的细胞壁相关蛋白质为细胞包被, 16.5% 的蛋白为假设蛋白, 6.2% 的蛋白为保守的假设蛋白, 还有 6.2% 蛋白为功能未知蛋白, 其他功能的蛋白含量都很少; 这些蛋白质的分子量主要分布在 4000~118000Da, pH 值主要分布在 4~12 之间, 其中 31.96% 的蛋白质的 pH 值小于 7, 68.04% 的蛋白质 pH 值大于 7, 10.31% 的蛋白 pH 大于 10。通过这种方法构建的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱, 为以后各种环境中 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的研究提供了有价值的基础性研究。

本研究还采用差异蛋白质组学的方法, 对不同培养条件下 (单质硫和  $\text{Fe}^{2+}$  为营养源) *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白差异表达谱进行了研究。采用双向电泳的方法分离蛋白, 结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF/MS) 对分离蛋白进行鉴定。双向电泳结果经 PDQuest 软件分析后表明有 104 个差异蛋白出现, 目前已经

鉴定出 18 个差异蛋白，其中 14 个为表达上调，4 个为表达下调。

**关键词：**嗜酸氧化亚铁硫杆菌，吸附，液相色谱—串联质谱（LC-MS/MS），双向电泳（2-DE），基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF/MS）

## ABSTRACT

At present, *Acidithiobacillus ferrooxidans* is the most widely applied and investigated bacteria in biometallurgy. The interaction at the interface between microbe and mineral plays an important role in this process. In this thesis, the cell wall related proteins of *A. ferrooxidans* have been studied. The surface structures researched at the aspect of Proteomics would be helpful to clarify the mechanisms of *A. ferrooxidans* attaching to minerals.

In this study, the cell wall related proteins of *A. ferrooxidans* were extracted and separated by SDS-PAGE. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry was applied to identify the proteins. Firstly, the proteins which were subjected to in-gel digestion with trypsin, were separated by liquid chromatography, and then were online analyzed by the coupled tandem mass spectrometry. As the peptide mass fingerprint (PMF) database has not been consummated, we construct our local putative *A. ferrooxidans* protein PMF database to be used in the mass spectrometry proteomisc analysis. The acquired 245 MS and MS/MS spectras were sent for searching in the proteins database with Mascot search engine for protein identification. The export signal and subcellular location of each obtained protein was also predicted. Portion of the aimed proteins were obtained. Among the identified proteins, 42.3% of them possess export of the Sec type, 7.2% of them show a twin arginine translocation (Tat) signal, 18.6% have lipoprotein signal peptides. 21.6% are non-classically secreted proteins, and 19.6% could be exported with their subcellular location prediction. According to their functional categories, 43.3% of them belong to Cell Envelope, 16.5% to Hypothetical Proeteins, 6.2% to Conserved Hypothetical Proteins, and 6.2% belonged to Unknown Functions. Also, there are a few other functional proteins. Furthermore, the molecular weights of these proteins are distributed in the range of 4000 to 118000Da. Their isoelectric points are between 4 and 12, among which 31.96% of which show the pH values

below 7, 68.04% higher than 7, and 10.31% over pH values of 10. This work provides fundamental research of the cell wall related protein of *A. ferrooxidans* by revealing the total expressed proteins.

We also studied the comparative proteomics of *A. ferrooxidans* grown under different energy resources ( $\text{Fe}^{2+}$  or sulphur). The cell wall related proteins of *A. ferrooxidans* were separated by the two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and then identified by the matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The resulted Images were quantitatively analyzed with the PDQuest 2D analysis software. The image analysis indicates 104 differentially-expressed protein spots, 18 of which have been identified.

**KEY WORDS:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

## 目 录

|   |     |
|---|-----|
| 摘 要 .....                                     | I   |
| ABSTRACT .....                                | III |
| 目 录 .....                                     | V   |
| 缩写词简表 .....                                   | VII |
| 第一章 绪论 .....                                  | 1   |
| 1.1 生物冶金研究进展 .....                            | 1   |
| 1.1.1 浸矿微生物研究进展 .....                         | 1   |
| 1.1.2 浸矿微生物与矿物界面作用研究进展 .....                  | 2   |
| 1.1.3 浸矿微生物表面结构研究进展 .....                     | 3   |
| 1.2 蛋白质组学研究进展 .....                           | 6   |
| 1.2.1 蛋白质组研究技术及应用 .....                       | 6   |
| 1.2.2 双向凝胶电泳(2-DE)技术 .....                    | 6   |
| 1.2.3 主要的蛋白质鉴定分析技术 .....                      | 7   |
| 1.3 课题研究的意义及主要内容 .....                        | 10  |
| 1.3.1 本研究的目的是和意义 .....                        | 10  |
| 1.3.2 本论文研究内容 .....                           | 11  |
| 1.4 论文研究总技术路线 .....                           | 12  |
| 第二章 实验材料和研究方法 .....                           | 13  |
| 2.1 实验材料 .....                                | 13  |
| 2.1.1 菌种 .....                                | 13  |
| 2.1.2 培养基 .....                               | 13  |
| 2.1.3 实验试剂 .....                              | 13  |
| 2.1.4 实验仪器 .....                              | 14  |
| 2.1 实验方法 .....                                | 14  |
| 2.2.1 菌种扩大培养 .....                            | 14  |
| 2.2.2 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白的提取 ..... | 14  |
| 2.2.3 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....                 | 15  |
| 2.2.4 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析 .....             | 15  |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.5 双向电泳 (2-DE) .....                                      | 17 |
| 2.2.6 差异蛋白的 MALDI-TOF/MS 分析 .....                            | 18 |
| 2.2.7 <i>A. ferrooxidans</i> 肽质量指纹图谱的构建 .....                | 19 |
| 2.2.8 <i>A. ferrooxidans</i> 蛋白质的数据库搜寻鉴定 .....               | 19 |
| 第三章 嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达图谱 .....                               | 20 |
| 3.1 引言 .....   | 20 |
| 3.2 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白含量测定 .....                 | 20 |
| 3.3 SDS-PAGE 结果 .....  | 21 |
| 3.4 LC-MS/MS 分析 .....  | 22 |
| 3.5 <i>A. ferrooxidans</i> 肽质量指纹图谱的构建及蛋白质鉴定 .....            | 23 |
| 3.6 序列分析 .....   | 28 |
| 3.7 实验讨论 .....   | 31 |
| 3.8 本章小结 .....   | 34 |
| 第四章 不同培养条件下嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达差异 .....                        | 35 |
| 4.1 引言 .....   | 35 |
| 4.2 两个不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白含量测定 .....       | 35 |
| 4.3 不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白 SDS-PAGE 结果 ..... | 35 |
| 4.4 不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白 2-DE 结果 .....     | 36 |
| 4.5 不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白 2-DE 结果分析 .....   | 38 |
| 4.6 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白重复组蛋白质点一致性分析 .....         | 40 |
| 4.7 不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白差异分析 .....         | 41 |
| 4.8 不同培养条件下 <i>A. ferrooxidans</i> 细胞壁相关蛋白差异鉴定 .....         | 43 |
| 4.9 实验讨论 .....   | 47 |
| 4.10 本章小结 .....  | 48 |
| 第五章 研究结论与展望 .....  | 49 |
| 5.1 研究结论 .....   | 49 |
| 5.2 展望 .....   | 49 |
| 参考文献 .....   | 51 |
| 致 谢 .....  | 59 |
| 研究生阶段主要研究成果 .....  | 60 |

## 缩写词简表

| 英文缩写         | 英文名称  | 中文名称                  |
|--------------|---|-----------------------|
| MS           | mass spectrometry   | 质谱                    |
| MS/MS        | tandem mass spectrometry  | 串联质谱                  |
| LC-MS/MS     | liquid chromatography-<br>coupled with tandem mass<br>spectrometry                    | 一维色谱-质谱/质谱            |
| Tris         | Tris(hydroxymethyl)<br>aminomethane   | 三羟甲基氨基甲烷              |
| MALDI-TOF-MS | matrix-assisted<br>laser-desorption/ionization<br>time-of-flight mass<br>spectrometry | 基质辅助激光解吸/<br>电离飞行时间质谱 |
| ACN          | acetonitrile  | 乙腈                    |
| BSA          | bovine serum albumin  | 牛血清白蛋白                |
| IAA          | iodoacetamide   | 碘乙酰胺                  |
| SDS          | sodium dodecylsulfate   | 十二烷基硫酸钠               |
| IEF          | isoelectric focusing  | 等电聚焦                  |
| TFA          | Trifluoroacetic acid  | 三氟乙酸                  |
| BSA          | bovine serum albumin  | 牛血清白蛋白                |

## 缩写词简表续

| 英文缩写     | 英文名称  | 中文名称                  |
|----------|---|-----------------------|
| SDS-PAGE | Sodium dodecylsulfate<br>polyacrylamide gel<br>electrophoresis) | 十二烷基硫酸钠-聚<br>丙烯酰胺凝胶电泳 |
| 2-DE     | two-dimensional<br>polyacrylamide gel<br>electrophoresis        | 二维聚丙烯酰胺凝<br>胶电泳       |
| TEMED    | N,N,N',N'-tetra methyl<br>ethyl<br>ethylene diamine             | 四甲基乙烯基二胺              |
| PMF      | Peptide mass fingerprint  | 肽质量指纹图谱               |

## 第一章 绪论

### 1.1 生物冶金研究进展

生物冶金是借助以矿物为营养基质的微生物将矿物氧化分解,使其中有价金属离子进入溶液,通过进一步的纯化、浓缩获得金属的一种新技术,它的实质是加速硫化矿物自然转化成氧化物。早在公元前 2 世纪,我国就有采用湿法冶金技术生产铜的记载<sup>[1]</sup>,1670 年西班牙人里奥廷托(Rio Tinto)矿坑水中回收细菌浸出的铜,标志着细菌浸矿的开始。利用微生物冶金具有以下优点:(1)应用范围广,所有硫化矿都可以用细菌浸出;(2)污染小,冶金过程中产生的污染仅限于提取范围内的酸性水;(3)成本低、能耗少,所需投资少;(4)流程短,经生物浸出-萃取-电积即可得到产品;(5)可大规模应用。生物冶金技术综合了湿法冶金、微生物学、矿物加工、化学和环境工程等多个学科的研究成果。1955 年,Zimmerley.S.R 等<sup>[4, 5]</sup>首次申请了生物堆浸专利并将该专利授权给 Kennecott 铜业公司,该公司在二十世纪 50 年代应用该技术,标志着生物冶金技术现代工业应用的开端。如今,世界上每年约有 20 亿美元的金属是用生物技术提取的,其中以铜为主,而且每年以 12%~15%的速度高速增长<sup>[2]</sup>。

目前,生物冶金技术的研究已不再局限于回收低品位矿,利用微生物进行铁、钴、镍、锌、铬、锰、铅、砷、铝等几乎所有硫化矿的浸出研究已经广泛展开<sup>[3-5]</sup>。美国、澳大利亚、南非在该领域的研究走在世界前列,根据美国国家委员会(NRC)2001 年的研究报告,未来 20 年,美国矿业最重要的革新将是采用湿法冶金工艺取代有色行业传统的熔炼工艺;欧盟国家紧随其后,为了缩小差距,专门启动了 BioMinE (Biotechnology for Metal-bearing material In Europe)计划<sup>[6]</sup>,在欧盟的 12 个成员国以及南非和罗马尼亚集合 7 家研究所,14 所大学以及 2 个政府部门展开联合研究。我国在生物冶金领域的研究相对滞后,随着目前资源短缺、环境恶化的形势日趋紧张,国家在该领域的投入也在加大,2004 启动了 973 生物冶金重大基础研究项目,同时,我国已经在德兴铜矿<sup>[7]</sup>、广东大宝山铜矿<sup>[8]</sup>、云南官房等地建立了研究和生产一体的生物浸出产业化项目。

#### 1.1.1 浸矿微生物研究进展

人们对生物冶金技术的使用很早,但是生物冶金技术在最初的几百年里的发展十分缓慢,1687 年,在瑞典中部的 Falun 矿,人们使用微生物技术已经至少浸

出了 200 万吨铜，但当时人们对其反应机理并不清楚。直到 1947 年，Colmer 和 Hinckle<sup>[9]</sup>首先从酸性矿坑水中分离出能氧化硫化矿物的氧化亚铁硫杆菌并对其特性进行了研究。其后，Temple 和 Leathen 对这种细菌的生理特性进行了研究，发现这种细菌能将  $\text{Fe}^{2+}$  氧化为  $\text{Fe}^{3+}$ ，并能将矿物中的硫化物氧化为硫酸<sup>[10-11]</sup>。1954 年，L.C.Bryner 和 J.V.Beck 等人开始利用该菌种进行硫化铜矿石的实验室浸出试验研究，并发现该细菌对硫化矿具有明显的氧化作用<sup>[12]</sup>。至此，微生物在矿业中的应用结束了长期低效率盲目应用的阶段，随之而来的是对细菌浸矿理论大量的、系统的研究，包括浸矿细菌的分离、鉴定和育种，细菌浸出过程的热力学、动力学、浸矿机理等。细菌浸出的直接作用、间接作用，硫化矿细菌浸出的生物—电化学等物化模型也逐渐建立。

### 1.1.2 浸矿微生物与矿物界面作用研究进展

在生物冶金体系中存在着矿物/水、矿物/微生物、矿物/矿物以及微生物/溶液/矿物/气相几个复杂的界面作用。吸附是微生物生命活动的基本特征，也是微生物与矿物作用的第一步。细菌吸附至矿物表面无论对于细菌在自然环境中的生存，还是对于矿物工业中的运用方面都具有十分重要的意义。

微生物与矿物相互作用导致了微生物表面以及与其发生作用的矿物表面的化学性质发生了变化。研究表明细菌与矿物表面的相互作用依赖许多物理的和生物化学的参数。2000年M. L. Sampson<sup>[13]</sup>等人综合报道了细菌通过各种方式吸附到矿物表面：1、分泌粘液层(Golovaceva,1979)；2、分泌结合蛋白受体(Sakamoto等1989, Ohmara等1996, Ohmura和Blakel1997)；3、通过化学吸附(Sohawffer等1963)；4、通过多糖—蛋白质复合物吸附(Takakuwa, 1979)；5、通过菌毛方(Weiss,1973)。

有关细菌与矿物的吸附机理已有很多报道，尽管物理参数如颗粒大小，培育时间以及摇动速度对吸附过程是重要的，但研究表明真实的吸附机理是基于与体系的特异性的相互作用<sup>[14]</sup>。特异性相互作用可以定义为涉及离子、氢、化学的即结合蛋白的微观相互作用，而非特异性相互作用涉及宏观的性质，即疏水性、表面自由能和静电相互作用。1993年Barret等在细胞壁物质中发现不同功能团存在微生物表面荷电:羧基(-COOH)、氨基(-NH)和羟基(-OH)基团。1994年Blake<sup>[15]</sup>等发现静电相互作用仅仅定性地涉及*A. ferrooxidans*菌吸附到黄铁矿和硫。Loosdrechtvan等发现关于吸附各种菌包括*Thiobacillus versatis*的静电相互作用得到类似结果。Devasia<sup>[16]</sup>等提出，增加分别生长在无论是硫，黄铁矿还是黄铜上的*A. ferrooxidans*菌的疏水性可以帮助吸附过程。他通过测定细菌的接触角的差异表明疏水细菌比亲水细菌具有更大的吸附性，而静电相互作用的影响显示出随着疏

水性的降低而增加。

而Ohmura和Blake(1997)及Sasaki(1999)先后报道了特异蛋白aporusticyanin的作用类似于原初吸附受体。他们认为aporusticyanin是一个铁原子被4个氨基酸配位体包围并位于细菌表面,细菌形成的表面多糖-蛋白质复合物是它本身的连续表面,是细菌真正的功能表面。由于趋化性质细菌靠近硫化矿物颗粒表面,特异蛋白分别吸附到金属硫化物颗粒表面的铁和硫的部位,而后细菌中特异酶的活性部位在结合底物过程中其形状有所改变,形成与底物互补的形状,从而与底物分子发生紧密结合<sup>[17]</sup>。

此外,现代分子生物学研究也证明,无论是结构的还是功能的,不论是能量代谢还是信息代谢都无不与氢键有关。通常认为氢键键合是普遍存在的吸附机理。

### 1.1.3 浸矿微生物表面结构研究进展

人们通过多种方法对吸附行为进行了研究并提出了各种观点,如有报道<sup>[24]</sup>认为,矿物生长的细菌表面存在表面附器,它能促进形成牢固吸附的聚合桥,通过聚合桥发生不可逆吸附,疏水性和静电相互作用在初始吸附过程中起着重要作用;还有人认为外源凝集素对于多糖-蛋白质复合物纤维具有特定的吸引力并且也能促使在细菌与矿物之间形成聚合桥。由于细菌表面成分十分复杂,它们的物理、生物-化学性质直接影响着细菌吸附至矿物表面。细菌的表面结构主要是指细胞膜、细胞壁(如图1-1)及其特化结构。生物浸矿过程中细菌通过外膜与矿物接触并发生作用,外膜的多聚物成分与细菌吸附至矿物密切相关,通过外膜分泌出的多种酶是促进矿物溶解的高效催化剂。

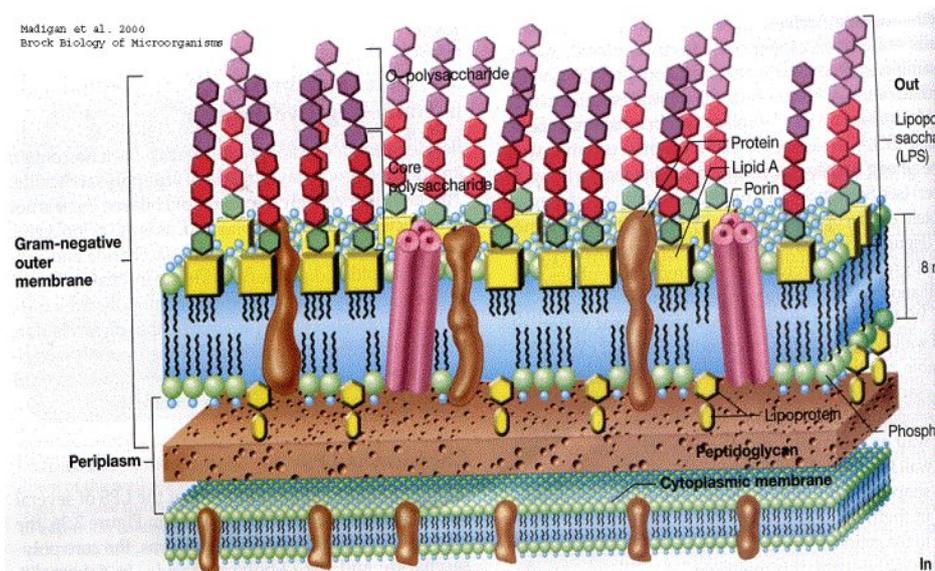


图1-1 革兰氏阴性菌细胞壁结构图

Figure 1-1. Cell wall structure of G<sup>-</sup>

M.Rodriguezleiva 等曾在吸附在黄铁矿表面的嗜酸氧化亚铁硫杆菌上探测到胞外多聚物层的存在,胞外多聚物(Extracellular Polymers, 简称 EPS)是微生物表面分泌的粘液层,它是附着于细胞壁外面的一层松散透明、粘液状或胶质状的物质。胞外多聚物的化学组成因菌种和培养条件而不同,主要是多糖,有时为多肽、蛋白质、脂肪以及由他们组成的复合物——脂多糖、脂蛋白等。R.Arrendondo 等分离出部分这种多聚物的物质,T.Gehrke 等则分析了这种多聚物层的化学成分<sup>[18-20]</sup>。W.Sand 指出,胞外多聚物层中  $Fe^{3+}$  的浓度大大高于其在溶液中的浓度,在硫化矿的分解中起着重要的作用。吸附细菌-矿物表面界面处的氧化反应比溶液本体中要快得多<sup>[21]</sup>。因此,研究浸矿细菌的胞外多聚层,以及多聚物成分在细菌与矿物的吸附过程中的所起到的作用对揭示浸矿机理非常重要。

傅建华<sup>[22]</sup>在对主要浸矿细菌的超微结构研究中发现,在硫培养基中生长的细菌表面会形成外膜泡<sup>[23]</sup>(见图1-2),就也是一种多功能的表面附属物。这些外膜泡形状多样、大小悬殊,球状物直径范围11~670 nm,管状物长度范围340~3800 nm,也有球状和管状相结合的复合体。它一方面将细胞的分泌泡或其他某些囊泡中的生物大分子与颗粒性物质如蛋白质、多核苷酸、多糖等,包裹在脂双层膜围绕的泡囊中跨膜运出细胞。囊泡内的可溶性蛋白分泌到细胞外,有的成为外周蛋白,有的形成胞外基质组分,有的作为营养成分或信号分子扩散到胞外。另一方面,外膜泡的存在为形成细菌与矿物之间的“聚合桥”提供了物质基础。此外,他还发现外膜泡仅在以固体基质(S)为能源的培养基中才会形成,而且是出现在细菌的吸附面,它在细菌与矿物复杂的界面作用中起着极其重要的作用。这些外膜泡中所包含的酶类等物质的研究证实对进一步阐明细菌浸矿的机理具有重要意义。



硫培养 *A. ferrooxidans* (40000 ×)

$Fe^{2+}$  培养 *A. ferrooxidans* (50000 ×)

图1-2 *A. ferrooxidans* 外膜泡扫描电镜图谱

Figure 1-2. Out Membrane Vacuoles of *A. ferrooxidans* by Scan Electron Microscope  
a. *A. ferrooxidans* cultured in S(40000 ×); b. *A. ferrooxidans* cultured in  $Fe^{2+}$ (50000 ×)

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌的主要表面成分, 约占细菌干重的3.4%, 每个细菌表面约有100多万个脂多糖分子, 它和蛋白质、磷脂、脂蛋白等共同形成革兰氏阴性细菌细胞壁的外膜。作为主要表面成分, 脂多糖在细菌和外环境的相互作用中扮演着重要角色。

外膜蛋白(out membrane protein,简称 Omp)在细菌吸附至矿物过程中也同样起着十分重要的作用。革兰氏阴性菌的主要外膜蛋白有3种: 基质蛋白, OmpA蛋白和脂蛋白。外膜蛋白是存在于外膜之中及与外膜有关的所有蛋白的总称, 其种类繁多。研究表明, 外膜蛋白主要是一些支持、构架蛋白, 主动运输孔蛋白、含铁蛋白受体、输出孔道蛋白、蛋白运送孔蛋白, 还有一些酶(如脂肪酶、蛋白酶等)<sup>[93]</sup>。Ohmura 和 Blake (1997)以及 Sasaki 等(1999)研究了 *Acidithiobacillus ferrooxidans*(ATCC23270)吸附至黄铁矿的过程, 表明吸附不是由于疏水作用和静电作用引起, 而是特异蛋白 aporusticyanin 充当着吸附受体作用。Renato Arrdeondo 等人<sup>[47]</sup>; 运用紧靠 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的表面蛋白的抗血清进行了点免疫测定后得出结论, 部分驱除 LPS 暴露出细菌的更多的相对分子质量为 40000 的外膜蛋白。这种暴露蛋白的增多和 LPS 的减少使细菌表面的疏水性增强, 吸附至疏水的硫颗粒表面和 <sup>14</sup>C-十二烷酸结合酸的能力分别比对照增加 0.5 倍和 2.5 倍。研究表明, 不仅 LPS 而且表面蛋白在 *A. ferrooxidans* 吸附至固体表面过程中起着重要作用。FTIR 光谱学研究揭示了 *A. ferrooxidans* 生长期间暴露于硫化矿, 其表面存在-NH<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH、-CONH、-CO、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>、-CH 和-COOH 功能团, 它们的存在能够促进细菌吸附到硫化矿。这些研究结果表明细菌的某些生理特性受环境条件的调节, 并推论在有固体存在的基质中生长的细菌表面有蛋白质膜存在。

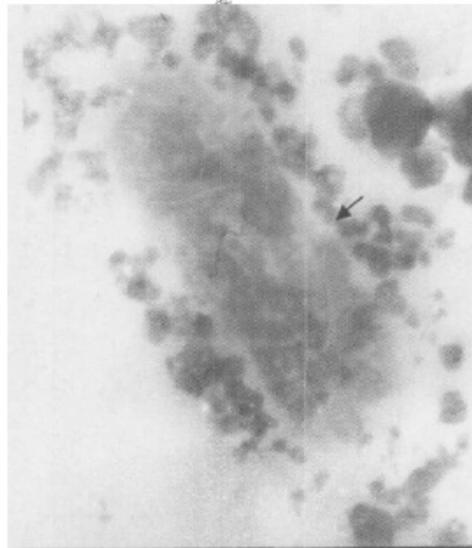


图1-3 *A. ferrooxidans*细胞表面蛋白扫描电镜图谱(60000×)

Figure 1-3. Surface proteins of *A. ferrooxidans* by Scan Electron Microscope (60000×)

## 1.2 蛋白质组学研究进展

### 1.2.1 蛋白质组研究技术及应用

对于许多生物体来说,目前的研究已进入后基因组时代,如许多种微生物(大肠杆菌,流感嗜血杆菌等约 50 多种)、果蝇以及人类等的基因组序列,已经测定完毕,借助计算机,可获得相关的信息。“后基因组阶段”就是要研究细胞内或机体内蛋白的结构、功能及相互作用。基因组学(genomics)是一种对细胞的静态描述,主要指其结构和功能;转录组学(transcriptomics)是对细胞一种动态的过程的研究,而蛋白质组学(proteomics)才是真正的对基因的功能(或称结果)进行研究的一门科学,通常亦称之为功能基因组学(functional genomics)。但是,这两者又有一定的区别,蛋白质组学是专门研究细胞内全部蛋白的动态表达,其不但包括功能基因组学中所指的全部蛋白,而且还包含一部分非基因组编码的蛋白,如病毒中的蛋白,其不是由基因组编码。蛋白质组学能以较快的速度回答以前需多年才能解决的机体生物代谢的一些基本问题。

蛋白质组(proteome),这一概念是由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 在 1994 年提出的<sup>[25]</sup>,是指一个细胞或者组织表达的所有蛋白质(protein)。随着其所处环境的不同,如细胞所处的时期、外部环境的刺激等,所表达的蛋白的种类、数量亦不同,但总体而言,人体细胞所表达的蛋白种类和数量有 80%是应该相同的,亦称之为管家蛋白(housekeeping proteins)。

蛋白质组学(proteomics),是以蛋白质组为研究对象,是在蛋白质多肽谱和基因产物图谱技术的基础上发展起来的一门学科。它是在动态水平上通过对基因表达产物——蛋白质进行测定,来阐述环境、疾病、药物等对细胞代谢的影响,并分析其主要作用机理,解释基因表达调节的主要方式。它不是一种单纯的方法学,而是一新领域,是以蛋白质为核心来研究蛋白质在生命活动中的主要行为。

### 1.2.2 双向凝胶电泳(2-DE)技术

蛋白质组研究所用到的分离技术不只一种,要想用一种方法就可以观察一个生物体,一个器官,一个组织或一个细胞中的全部蛋白质几乎是不可能的。其原因有几个,首先,细胞内蛋白质的表达丰度相差很大,有的甚至到 6 个数量级,高丰度的蛋白质在分离鉴定的过程中经常将低丰度的蛋白质掩盖掉了,导致一些低丰度的蛋白质很难用目前的方法检测到;其次,蛋白质的表达具有时间上和空间上的差异性。目前在蛋白质研究中应用最多的分离技术是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,这也是目前对蛋白质分辨率最高,重复性最好的分离技术<sup>[26]</sup>。

双向凝胶电泳技术是 1975 年 O'Farrell 和 Klose 各自建立的。到现在,双向

电泳技术已经可以在一张凝胶上分离几千个甚至上万个蛋白质点。双向凝胶电泳的基本原理是使蛋白质先根据其等电点的不同在 pH 梯度胶进行等电聚焦电泳分离,然后再按照它们的分子量大小的不同进行 SDS-PAGE 第二次电泳分离,从而把复杂的蛋白质混合物中的蛋白质在二维平面上分离开。2-DE 根据第一向等电聚焦的条件和方式不同分为三种系统:第一种系统是在聚丙烯酰胺管胶中进行,两性电解质载体在外加电场作用下形成梯度,这一系统称为 ISO-DALT。但该方法随着聚焦时间的延长, pH 梯度不稳定,易产生阴极漂移,重复性差,上样量低,不利于不同实验室间进行图谱比较和数据发布;但通过优化各种电泳条件,可以得到相对稳定的图谱。第二种系统称为 IPG-DALT,在第一向电泳使用丙烯酰胺和不同 pH 值的 Immobilines(丙烯酰胺的衍生物)共聚,从而建立具有固定的 pH 梯度的凝胶(IPG 胶)。它的优点是:(1)不产生电极漂移;(2)pH 梯度稳定;(3)上样量大,可达几十毫克;(4)重复性好,可以使不同实验室之间的结果进行比较。第三种系统称为 NEPHGE,是非平衡 pH 梯度电泳。主要用于分离碱性蛋白质,蛋白质在等电聚焦场中达到平衡前,电泳就已经结束了<sup>[27]</sup>。

但是双向凝胶电泳技术也具有几个非常明显的缺点需要去克服:(1)低拷贝量蛋白质的鉴定。这一缺点除了增加双向凝胶电泳灵敏度的方法克服外,最有希望的还是把基质辅助的激光解析/离子化质谱用于 PVDF 膜上,但当前的技术还不能检出拷贝数低于 1000 的蛋白质。(2)极酸或极碱蛋白的分离。(3)极大(>200 kD)或极小(<10 kD)蛋白的分离。(4)难溶蛋白的检测,包括一些重要的膜蛋白。(5)得到高质量的双向凝胶电泳需要精湛的技术,因此迫切需要自动双向电泳仪的出现<sup>[28]</sup>。

### 1.2.3 主要的蛋白质鉴定分析技术

经 2-DE 分离、染色,得到生物样品蛋白质表达谱后,需对蛋白质作进一步的分析鉴定,包括各蛋白质的氨基酸组成分析、蛋白质的定量分析、蛋白质的肽序列分析等。具体说来就是采用计算机图像分析技术,对所采集的蛋白图谱上的蛋白质点进行定位、定量、图谱比较、差异点寻找等。对胶上蛋白点的鉴定有两种不同的技术路线:一是,将电泳分离开的蛋白质从胶上转印到膜上,然后用 Edman 降解或氨基酸组成分析等传统生物化学方法进行分析,进入特定的数据库检索系统,实现对蛋白质的鉴定;二是将胶上的蛋白质直接进行酶解,回收酶切片段,采用质谱技术,进入相应数据库检索,实现蛋白质的鉴定。以质谱为基本技术的蛋白质鉴定技术路线,以其灵敏度高、速度快、易实现自动化等特点,已成为蛋白质组研究中主要的蛋白质鉴定技术。

### 1.2.3.1 Edman 降解法测 N 端序列

Edman 降解法测 N 端序列的原理为蛋白质和多肽的自由-氨基经与异硫氰酸苯酯(PITC)试剂偶联后,与其紧挨的第二个残基的键合力大大减弱,很容易断裂。在无水条件下酸(无水三氟乙酸)裂解,仅仅切下反应的那个氨基酸,此氨基酸形成 ATZ-氨基酸。紧挨的第二个氨基酸残基暴露出自由的  $\alpha$ -氨基,又可与 PITC 进行偶联反应。ATZ-氨基酸不稳定,三氟乙酸水溶液(25%)条件下可转化成稳定的 PTH-氨基酸。PTH-氨基酸可以通过薄层层析,气相色谱,高效液相色谱等各种手段进行分析。尽管 Edman 降解法测序速度缓慢,费用偏高,灵敏度也不如快速发展的质谱,但它测定的肽序列非常准确,因此成为蛋白质可靠鉴定的重要依据。但 Edman 降解法的局限性主要在于不能对环形肽链及 N 端被封闭的肽及蛋白进行测序,也不能测知某种被修饰的氨基酸<sup>[29]</sup>。

### 1.2.3.2 质谱技术

质谱已成为鉴定蛋白质的重要技术,这主要归功于离子化技术的发展及基因组大规模测序的成就。质谱技术的基本原理是样品分子离子化后,根据不同离子之间的质荷比( $m/z$ )的不同来分离并确定分子量。80年代初提出的快原子轰击(fast atom bombardment, 简称 FAB)电离技术使质谱技术应用于蛋白质和肽的结果测定成为现实。80年代末又发明了两种新的离子化技术,即基质辅助的激光解吸/离子化(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)及电喷雾离子化(electrospray ionization,ESI),这两种技术解决了极性大、热不稳定的蛋白质、多肽分子的离子化和大分子的测量问题,在灵敏度、准确性和对混合物的分析能力均有显著改善,从而拓宽了质谱技术在蛋白质领域中的应用。

另外,对于蛋白质和多肽,质谱的发展还有一个重要的用途是肽的测序。这是采用串联质谱(Tandem-MS),即在第一级质谱得到肽的分子离子,选取目标肽的离子作为母离子,与惰性气体碰撞,使肽链中的肽键断裂,形成一系列离子,即 N 端碎片离子系列(B 系列)和 C 端碎片离子系列(Y 系列),将这些碎片离子系列综合分析,可得出肽段的氨基酸序列。Wilm 等应用钠喷串联质谱(nano-electrospray tandem mass spectrometry)能在较低的 fmol 量上测得肽段序列。在 MALDI-MS 方面,近年来可用源后衰减-基质辅助的激光解吸/离子化质谱(post-source decay MALDI-MS, PSD-MALDI-MS)技术测得肽序列<sup>[30]</sup>。

## 1. 电喷雾质谱技术(ESI)<sup>[49]</sup>

电喷雾质谱技术(Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)是在毛细管的出口处施加一高电压,所产生的高电场使从毛细管流出的液体雾化成细小的带电液滴,随着溶剂蒸发,液滴表面的电荷强度逐渐增大,最后液滴崩解为大

量带一个或多个电荷的离子,致使分析物以单电荷或多电荷离子的形式进入气相。电喷雾离子化的特点是产生高电荷离子而不是碎片离子,使质量电荷比( $m/z$ )降低到多数质量分析仪器都可以检测的范围,因而大大扩展了分子量的分析范围,离子的真实分子质量也可以根据质荷比及电荷数算出。

## 2. 基质辅助激光解吸附质谱技术 (MALDI) [50~53]

基质辅助激光解析电离 (MALDI) 是由德国科学家 Karas 和 Hillenkamp 发现的。将微量蛋白质与过量的小分子基体的混合液体点到样品靶上,经加热或风吹烘干形成共结晶,放入离子源内。当激光照射到靶点上时,基体吸收了激光的能力跃迁到激发态,导致蛋白质电离和汽化,电离的结果通常是基体的质子转移到蛋白质上。然后由高压将电离的蛋白质从离子源转送到质量分析器内,再经离子检测器和数据处理得到质谱图。TOF 质量分析器被认为是与 MALDI 的最佳搭配,因为二者都是脉冲工作方式,在质量分析过程中离子损失很少,可以获得很高的灵敏度。TOF 质量分析器结果简单,容易换算,蛋白质离子在飞行管内的飞行速度仅与他的 $(m/z)^{-1/2}$ 成正比,因此容易通过计算蛋白质离子在飞行管内的飞行时间推算出蛋白质离子的  $m/z$  值。与传统质量分析器相比,更易得到高分辨率和高测量精度;速度快,离子飞行时间仅为几个  $\mu\text{s}$  和约  $100\mu\text{s}$  之间;质量范围宽,可以直接检测到几十万道尔顿的单电荷离子。飞行时间质量分析器被认为是 21 世纪最有应用前景的质量分析器。

## 3. 傅立叶变换-离子回旋共振质谱 (FT-ICR-MS) [54,55]

傅立叶变换-离子回旋共振质谱法 (FT-ICR-MS) 是离子回旋共振波谱法与现代计算机技术相结合的产物。傅立叶变换-离子回旋共振质谱法是基于离子在均匀磁场中的回旋运动,离子的回旋频率、半径、速度和能量是离子质量和离子电荷及磁场强度的函数,当对离子施加与其回旋频率相同的射频场作用时,离子将同相位加速到一较大的半径回旋,从而产生可被接受的类似电流的信号。傅立叶变换-离子回旋共振质谱法所采用的射频范围覆盖了欲测定的质量范围,所有离子同时被激发,所检测的信号经过傅立叶变换,转换为质谱图。其主要优点有:容易获得高分辨;便于实现串极质谱分析;便于使用外电离源并与色谱仪器联用。此外,他还有灵敏度高,质量范围宽,速度快,性能可靠等优点。

## 4. 快原子轰击质谱技术 (FABMS)

快原子轰击质谱技术 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, FABMS) 是一种软电离技术,是用快速惰性原子射击存在于底物中的样品,使样品离子溅出进入分析器,这种软电离技术适于极性、热不稳定的化合物的分析,特别适用于多肽和蛋白质等的分析研究。FABMS 能提供有关离子的精确质量,从而可

以确定样品的元素组成和分子式。而 FABMS-MS 串联技术的应用可以提供样品较为详细的分子结构信息，从而使其在生物医学分析中迅速发展起来。

质谱有不少优点，还能用于翻译后修饰的分析(糖基化,磷酸化)，但只适于小分子量的肽段。

### 1.2.3.3 氨基酸组成分析

氨基酸组成分析由于耗资低而常用于蛋白质鉴定。其原理是通过测定蛋白质中各氨基酸所占摩尔百分数(%)或各氨基酸的摩尔比率，然后与数据库中已知蛋白质的理论值进行比较，给出匹配分数值大小，分数值越小，表示其与真正蛋白质越接近。测定氨基酸组成常用的方法是酸水解，但酸水解时常造成色氨酸及半胱氨酸的破坏<sup>[31]</sup>，如要测定这两种氨基酸的组成，需用特殊方法。虽然该法经济、快速，但灵敏度低，约十几皮摩尔，且非常可靠的鉴定往往需要配合其它鉴定手段。氨基酸组成分析对杂质污染较敏感，如样品含有杂蛋白，会严重影响鉴定结果。氨基酸组成分析在早期蛋白质组学研究中有所应用，是一种传统的蛋白质化学分析法，它的通量和准确度难以满足蛋白质组学研究的需要。

## 1.3 课题研究的意义及主要内容

### 1.3.1 本研究的目的是和意义

当前微生物冶金面临的主要困难有：缺少针对低品位复杂硫化矿的高效专属菌种，缺乏对细菌与矿物作用的本质认识，工业应用的现场控制不足等。其中微生物-矿物界面作用研究的地位处在承上启下的位置：一方面为高效菌种的筛选提供指导；另一方面对实际浸矿过程的强化提供了理论依据，对新型反应器的研制开发指明方向。蛋白质是生理功能的执行者和生命现象的直接体现者，对细菌表面的蛋白质结构和功能的研究将直接阐明细菌在不同条件下的变化机制；蛋白质本身的存在形式和活动规律，如翻译后修饰、蛋白质间相互作用及蛋白质构象等问题，仍依赖于直接对蛋白质的研究来解决。因此要对生命的复杂活动有全面和深入的认识，必然要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。

此外，在细胞壁周质空间中存在一些细菌氧化电子传递链上的关键蛋白或酶，如蓝铜蛋白、铁硫簇蛋白、细胞色素等，本文研究的目的是通过对嗜酸氧化亚铁硫杆菌全部细胞壁相关蛋白质的分离鉴定，并对其按功能分类，为进一步深入研究微生物/矿物的复杂界面作用机制打下了基础，同时也为浸矿机理研究提供一些依据。

### 1.3.2 课题受资助情况

本论文课题受以下项目资助：

(1) 国家自然科学基金创新群体项目“硫化矿物生物提取的基础研究”(50321402)；

(2) 973 项目“微生物冶金的基础研究”课题四“硫化矿微生物浸出体系复杂界面作用”(2004CB619204)；

(3) 国家自然科学基金“金属硫化矿浸出专属性微生物多样性与复杂界面作用”(30400010)；

(4) 国家自然科学基金“不同能源培养的 *A. ferroxidans* 比较蛋白质组学研究”(30570047)。

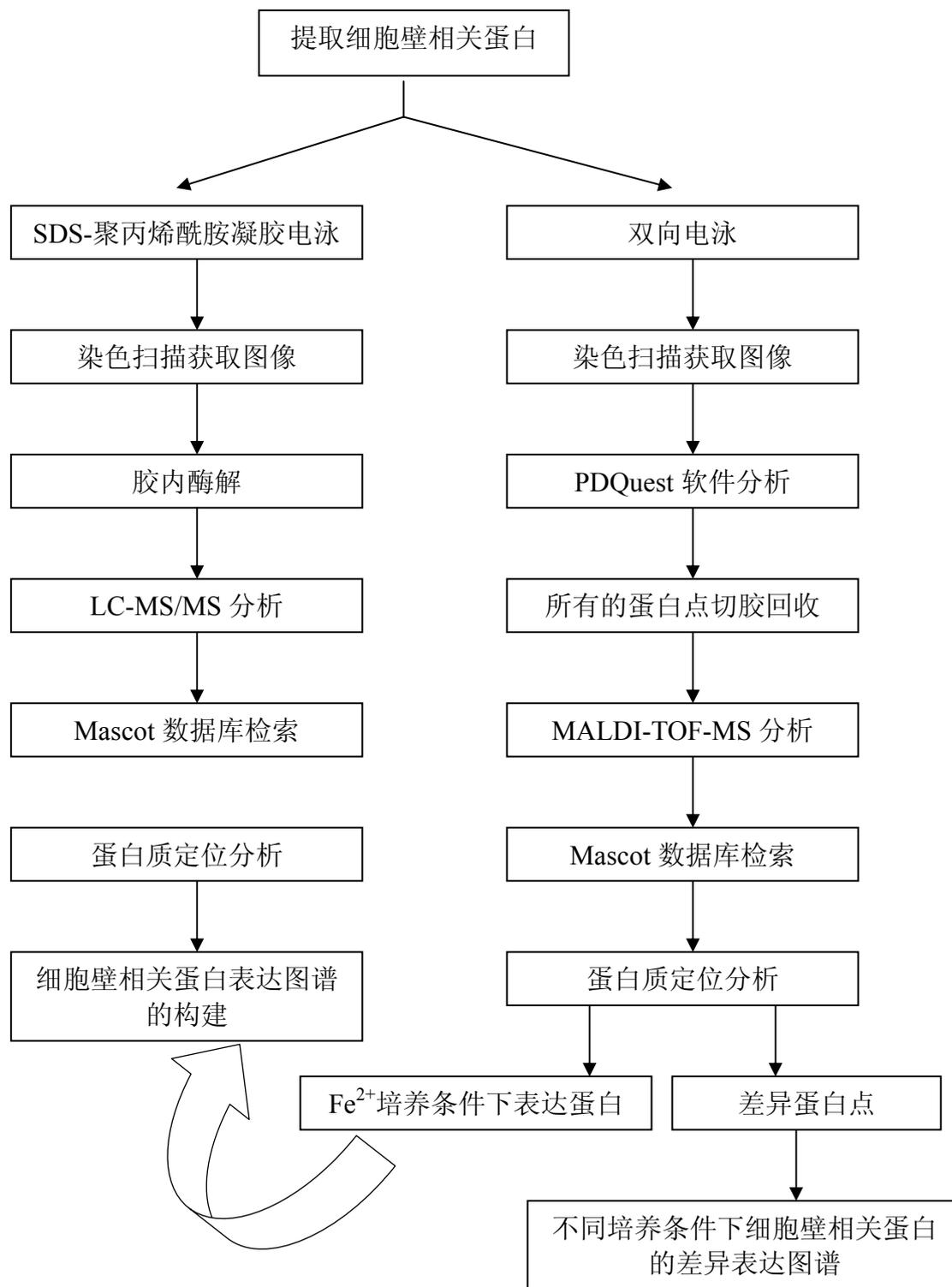
### 1.3.3 本论文研究内容

(1) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达图谱的建立；

(2) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌蛋白质肽质量指纹图谱建立；

(3) 不同培养条件下嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白差异表达。

### 1.4 论文研究总技术路线



## 第二章 实验材料和研究方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌种

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270)，本实验室保存菌种。

#### 2.1.2 培养基

##### A. 基础培养基

采用改进的 9K 基础培养基，其组分是： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g, KCl 0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01 g, 蒸馏水 1000 mL, pH2.0。

##### B. 能源培养基

在改进的 9K 基础培养基的基础上，分别添加 0.9% 的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (44.7 g/L)，1% 单质 S (1 g/L) 作为微生物生长的能源物质。

#### 2.1.3 实验试剂

丙烯酰胺(北京鼎国, Genview 分装)

N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(北京鼎国, Genview 分装)

尿素(北京鼎国, Genview 分装)

SDS (北京鼎国, sigma 分装)

Tris (北京鼎国, Genview 分装)

TEMED (中国医药上海化学公司)

二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT) (北京鼎国, Genview)

胰蛋白酶( Trypsin ) ( Promega 公司)

碘乙酸胺 (IAA) (Acros 公司)

三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA) (Acros 公司)

CHAPS (Acros 公司)

PMSF (Acros 公司)

低分子量蛋白标准(Amersham Biosci-ences 公司)

固相 pH 梯度干胶条 IPG strip (Amersham 公司产品, 非线性 pH 3~10, 24cm)  
immobilized pH gradient( IPG)缓冲液(pH3-IOL),  
甲酸 (Amersham Pharmacia) (美国 Sigma 公司)  
碳酸氢钙 ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (美国 Sigma 公司)  
所有溶液均用 MilliQ 水配制

#### 2.1.4 实验仪器

Eppendorf-5301 离心机, 德国;  
Eppendorf-5804R 冷冻离心机, 德国;  
ALPHA LD-4 冷冻干燥机  
CR22G 高速冷冻离心机  
JY92-II 超声波细胞粉碎机  
DYCZ-26 双向电泳槽  
SCR-4 高压电泳仪  
752-紫外可见光分光光度计  
ProFlex TM III MALDI -TOF 质谱仪(BRUKER 公司)  
Ettan 双向电泳仪 (GE 公司)  
CaPLC 高效液相色谱仪 (Waters 公司)  
Micromass Q-ToF micro 质谱仪 (Waters 公司)

## 2.1 实验方法

### 2.2.1 菌种扩大培养

将实验室-70℃保存 *A. ferrooxidans* 菌种按 20mL/L 的比例接种于新鲜配制的改进的 9K 培养液中 (分别以  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和单质 S 为能源), 在 30℃ 的恒温摇床中培养, 转速 180 r/min 活化, 继而扩大培养。

### 2.2.2 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的提取

#### 1、蛋白质的提取

采用 Maurila<sup>[32]</sup>和 A1eljung<sup>[33]</sup>的方法, 根据 *A. ferrooxidans* 的特性稍作改良, 方法如下:

- 1) 以  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和单质 S 为能源分别培养 4 天和 7 天, 至稳定期, 离心 (10000 rpm, 15 min) 收集菌体;
- 2) 先用无菌 9K 基础液洗去铁矾或硫粉杂质, 再用冷的 PBS 缓冲液洗涤细菌 2 次;

- 3) 用20 mL PBS重悬菌体, 重悬液中加入溶菌酶(2 g/L), 37°C温育1 h。
- 4) 超声破碎;
- 5) 离心(12000 rpm, 15 min), 去上清, 沉淀用1mol/L氯化锂重悬, 20°C温育20 h;
- 6) 离心 (10000 rpm, 30 min), 收集上清, 并置于透析膜中4°C透析过夜;
- 7) 收集样品, 冻冻干燥至粉末状, -70°C冷藏备用。

## 2、蛋白质含量的测定

将-70°C保存的蛋白粉末用50~100 uL样品溶解液(8 mol/L尿素, 4% CHAPS, 2% IPG-Buffer, 40 mmol/L DTT)溶解, Bradford法测定蛋白浓度。步骤如下:

- 1)、考马斯亮蓝染色液在使用前应平衡温度至室温, 并温和颠倒混匀, 预热分光光度计;
- 2)、将0、10、20、30、40、50 uL牛血清(BSA)标准溶液(1 mg/mL)分别加入到试管中, 加入PBS补足到150 uL;
- 3)、向各试管中加入2.85 mL考马斯亮蓝染色液, 混匀, 室温放置5~10 min;
- 4)、以不含BSA的样品的吸光值为空白对照, 用分光光度计测定595 nm处的吸光值, 并记录读数;
- 5)、绘制标准曲线。
- 6)、将待测样品用同样的方法处理, 读取吸光度, 做3个重复, 计算平均值;
- 7)、在标准曲线上找出相应的读数, 并计算其浓度。

### 2.2.3 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照 Laemmli 方法<sup>[34]</sup>采用 Tris-甘氨酸不连续凝胶系统, 5%浓缩胶, 12%分离胶, 10 mA 恒流运行 20 min, 再恒流 20 mA 运行至溴酚蓝前沿到达分离胶底部。电泳结束后, 考马斯亮蓝 R-250 染色 2~4 h, 脱色液(15% 乙醇, 75% 冰乙酸)脱色至蛋白条带清晰可见。

### 2.2.4 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析

#### 1、LC-MS/MS 样品制备

- 1) 切胶: 将脱色完全的胶中有条带的区域从胶上切下来, 平均的切成7块, 分别置于7个1.5 mL的离心管;
- 2) 水洗: 切下来的胶块用 ddH<sub>2</sub>O 洗2次, 每次震荡后放置10 min;
- 3) 脱色: 每管加入25 mL MNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>的50%乙腈(ACN)溶液50~100 uL(根据胶块大小决定, 标准能被覆盖即可), 37°C保温30min, 去掉液体, 重复一次可完全脱色。若脱色不完全, 再加入直至脱色完全;

- 4) 脱水: 用 50~100 uL ACN 脱水至胶变白色不透明状, 去掉液体;
- 5) 冻干: 用封口膜封口, 冻干机中冻干 20 min, 取出时轻敲离心管底, 其中白色胶块在管中轻快跳跃即可;
- 6) 还原: 加入还原剂, 封口, 57°C 水浴 1 h;
- 7) 烷基化: 从水浴锅取出样品后, 室温冷却, 去掉过量的液体, 迅速加入等体积的烷基化试剂室温暗处放置 30 min;
- 8) 终止烷基化反应, 用 25 mM 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  洗掉碘乙酰胺 (IAA);
- 9) 脱水: 100% ACN 脱水至胶块变成白色;
- 10) 吸胀: 加入 25 mM 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 震荡, 静置 5 min, 吸出;
- 11) 脱水: 同步骤 8;
- 12) 冻干: 同步骤 4;
- 13) 加酶: 每管加入适量的酶液, 冰上放置 30 min;
- 14) 检查酶液吸胀情况, 加覆盖液 20uL, 封口, 37°C 保温 16~18 h。
- 15) 将样品从 37°C 水浴锅中取出后, 10000×g 离心 5 min;
- 16) 将上清转移到洗干净的离心管中;
- 17) 在剩余胶块中加入萃取液;
- 17) 超声 15 min, 间隔 5 min, 重复超声 15 min。水温不超过 40°C;
- 18) 10000×g 离心 5 min, 合并上清;
- 19) 冷冻离心干燥至 30~50 uL, 备用。

## 2、液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析

LC-MS/MS使用的分析柱为Waters公司的毛细管反相柱(150 mm×75 um)。柱前通过十通阀连接-预柱(5 mm×300 um)。流动相A液为含0.1%甲酸的水溶液, B液为含0.1%甲酸的乙腈, C液为含0.1%甲酸的水溶液。流速250 nL/min。样品在预柱中用C液脱盐后, 分析柱用以下梯度进行梯度洗脱: 5~65 min 乙腈浓度从5%上升至50%, 65~75 min 乙腈浓度保持在95%, 75~85 min A液平衡分析柱。

CaP LC (capillary liquid chromatography) 洗脱的肽片段进入质谱离子源后进行一级质谱(MS) 和串联质谱(MS/MS) 分析, 正离子检测模式。源温80°C, 锥孔电压60V, 喷嘴电压3000V, 检测器电压2700V。MS和MS/MS的转换通过仪器控制软件中的Automated Data Dependent Acquisition(DDA) 模式控制。满足设定条件的一级离子进行串联分析, 最大母离子数设为4。用Glu-fib的串联碎片校正仪器, 获得肽质量指纹谱。

## 2.2.5 双向电泳 (2-DE)

### 1、第一向——等电聚焦 (IEF)

参照文献方法<sup>[35,36]</sup>取出-20℃保存的 pH3~10 (240×30×0.5 mm) IPG 预制干胶条, 优化上样量 (1000 ug), 胶内上样方式按每根胶条总上样量为 1000ug 蛋白质的要求吸取所需体积的上清液, 再补加样品水化液(7 mol/L 脲、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mol/L DTT、2%载体两性电解质 pH3~10, 痕量溴酚蓝)使总体积达到 600 uL, 然后一起放入 Holder 槽中, 以胶面朝下的方式放入 IPG 干胶条并在其背面均匀滴加约 800 uL 覆盖液。等电聚焦的时间程序是按照 Step-n-hold 模式, 优化后程序如表 2-1。

表 2-1 等点聚焦程序中参数设置

Table 2-1 Parameters used for isoelectric focusing

| Step        | Voltage(V) | Step duration(h) | Volt-hours(Vh) | Gradient type |
|-------------|------------|------------------|----------------|---------------|
| Rehydration | 30         | 14               | 420            | Step-n-hold   |
| 1           | 500        | 1                | 500            | Step-n-hold   |
| 2           | 1000       | 1                | 1000           | Step-n-hold   |
| 3           | 3000       | 0.5              | 1500           | Step-n-hold   |
| 4           | 4000       | 0.5              | 2000           | Step-n-hold   |
| 5           | 5000       | 0.5              | 2500           | Step-n-hold   |
| 6           | 6000       | 1                | 6000           | Step-n-hold   |
| 7           | 7000       | 1                | 7000           | Step-n-hold   |
| 8           | 8000       | 4 或 5            | 32000 或 40000  | Step-n-hold   |

### 2、平衡

等电聚焦结束后, 取出胶条, 加入平衡液 A(8mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 0.1 % DTT)振荡平衡 15 min, 再换平衡液 B (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 2.5% IAA)振荡平衡 15 min。取出胶条滤干, 准备第二向电泳。

### 3、第二向——SDS-PAGE

将平衡后的胶条小心铺到第二向凝胶上, 注意胶条和凝胶间不能有气泡。将

浸泡有低分子量蛋白质标准的厚滤纸片加在胶条的碱性端。12.5%的分离胶，无浓缩胶，凝胶厚度为 1.5 mm，先以低电流(15 mA，每块胶)电泳 30 min，使得溴酚兰前沿到上下层交界面，而后提高电流至 30 mA，当溴酚兰前沿离凝胶下端 1 cm 左右时停止电泳，然后进行染色。

#### 4、染色、脱色

“Blue Silver”考马斯亮蓝，其成份及相应的浓度为：0.12%的 G-250，10%的硫酸铵、10%的磷酸、20%的甲醇<sup>[37]</sup>。染色 16~18 个小时，然后用 ddH<sub>2</sub>O 漂洗脱色。

#### 5、凝胶图像采集及分析

将双向凝胶电泳凝胶脱色后的凝胶板放在玻璃板上，用扫描仪扫描图像，再用 PDQuest 凝胶分析软件系统对 2-DE 图像进行参数设置(设置凝胶背景,最弱点,最小点和最强点等)、灰度计算、斑点检测等技术处理，得到双向凝胶图像(Gel Image)和胶点图谱(Gel Spot)。并利用 2D 标准和 SDS 低分子量标准蛋白对双向电泳凝胶图谱进行斑点分析，获得图谱上各蛋白点粗略的等电点与分子量。

### 2.2.6 差异蛋白的 MALDI-TOF/MS 分析

#### 1、MALDI-TOF/MS 样品制备

- 1) 切胶：用剪刀将 1000 mL Eppendorf 吸头尖端剪掉约 0.3 cm，孔的直径约为 2 mm，选择在图谱上感兴趣的点，用修剪后的吸头从凝胶上戳取蛋白质点，再转入 1.5 mL Eppendorf 管中；
- 2) 水洗：点切下来后用 ddH<sub>2</sub>O 洗 2 次，每次震荡后放置 10 min；
- 3) 脱色：每管加入 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 的 50%乙腈 (ACN) 溶液 20~50 uL (根据胶点大小决定，标准能被覆盖即可)，37℃保温 30 min，去掉液体，重复一次可完全脱色。若脱色不完全，再加入直至脱色完全；
- 4) 脱水：用 20~50 uL ACN 脱水至胶变白色不透明状，去掉液体；
- 5) 吸胀：加入 25 mM 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，震荡，静置 5 min，吸出；
- 6) 脱水：100% ACN 脱水至胶块变成白色；
- 7) 冻干：用封口膜封口，冻干机中冻干 20 min，取出时轻敲 EP 管底，其中白色胶块在管中轻快跳跃即可
- 8) 加酶：每管加入适量的酶液，冰上放置 30 min；
- 9) 检查酶液吸胀情况，加覆盖液 20 uL，封口，37℃保温 16~18 h。
- 10) 将样品从 37℃水浴锅中取出后，10000×g 离心 5 min；

- 11) 将上清转移到洗干净的 EP 管中;
- 12) 在剩余胶块中加入萃取液;
- 13) 超声 15 min, 间隔 5 min, 重复超声 15 min。水温不超过 40℃;
- 14) 10000×g 离心 5 min, 合并上清;
- 15) 冷冻离心干燥至 2~5 uL, 备用。

## 2、肽混合物的 MALDI-TOF/MS 分析

使用 BRUKER 公司的 ProFlexTMI II MALDI-TOF 质谱仪对样品进行分析,采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压为 20kV,射电压比为 1.12, N<sub>2</sub> 激光波长为 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 100 nsec, 真空度  $4 \times 10^7$  Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 获得了肽指纹谱。

### 2.2.7 *A. ferrooxidans* 肽质量指纹图谱的构建

从 NCBI 上下载 *A. ferrooxidans* 全部蛋白质序列, 转化为 Fasta 格式, 计算机编程模拟构建其 PMF 数据库, 命名为 AFE。此部分工作是在湖南师范大学曹锐博士的帮助下完成的。

### 2.2.8 *A. ferrooxidans* 蛋白质的数据库搜寻鉴定

MassLynx 软件采集的 MS 和 MS/MS 数据由 ProteinLynx 软件转换为含有一级母离子大小(m/z)和强度以及二级碎片离子大小的 PKL 文件。将这些文件输入数据库(NCBI nr), 使用 Mascot 软件中的未解析串联质谱数据检索功能(MS/MS Ions Search) 进行蛋白质的检索鉴定(<http://www.matrixscience.com>)。数据库检索所选择的参数如下: 固定修饰为 carbamoylmethylation (Cys), 蛋白酶为胰蛋白酶, 允许最大未酶切位点(missed cleavages) 数为 1, 肽段质量容忍误差(*Mr tolerance*) 为 1.0, 碎片离子的质量容忍误差为 0.5, 置信度阈值( significance threshold)  $P < 0.05$ 。当肽段的得分(Mowse score) 超过阈值(threshold) 即视为匹配的肽段, 以此为基础来进行蛋白质的鉴定<sup>[38]</sup>。

## 第三章 嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达图谱

### 3.1 引言

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*A. ferrooxidans*) 是目前微生物冶金领域研究最多的菌种, 并被认为是酸性浸矿环境中浸矿的主导菌种<sup>[65]</sup>。NeLson 等人研究指出<sup>[66]</sup>, *A. ferrooxidans* 主要代谢是氧化  $\text{Fe}^{2+}$  为  $\text{Fe}^{3+}$  而获得能量, 亦可氧化硫化矿物、元素硫、及可溶硫化物, 如硫代硫酸盐。

本文通过对硫酸亚铁培养的 *A. ferrooxidans* 细全部细胞壁相关蛋白的提取、分离、分析及鉴定, 构建其表达图谱, 为揭示 *A. ferrooxidans* 与矿物吸附机理提供实验依据。

### 3.2 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白含量测定

Bradford 方法是一种快速, 简单, 可靠的测定蛋白质含量的方法。此方法的干扰物质少, 但是因为染料(G-250)与不同蛋白质的相互作用不尽一致, 因此不是一种严格的定量方法。但是此方法简单易行, 可以得到相对准确的蛋白质含量, 因而我们采取了这种方法来测定提取蛋白质的含量。以 BSA 为标准蛋白做标准曲线, 计算标准的平均光吸收值, 以蛋白质量为横坐标, 吸收值为纵坐标做标准曲线图(图 3-1), 使用标准曲线推断出样品对应的蛋白质的量。由图可知: 标准曲线的相关系数达 0.99959,  $\text{SD}=0.00808$ ,  $P<0.001$ , 已经相当可信。提取的细胞壁相关蛋白质的浓度为 9.64 g/L。

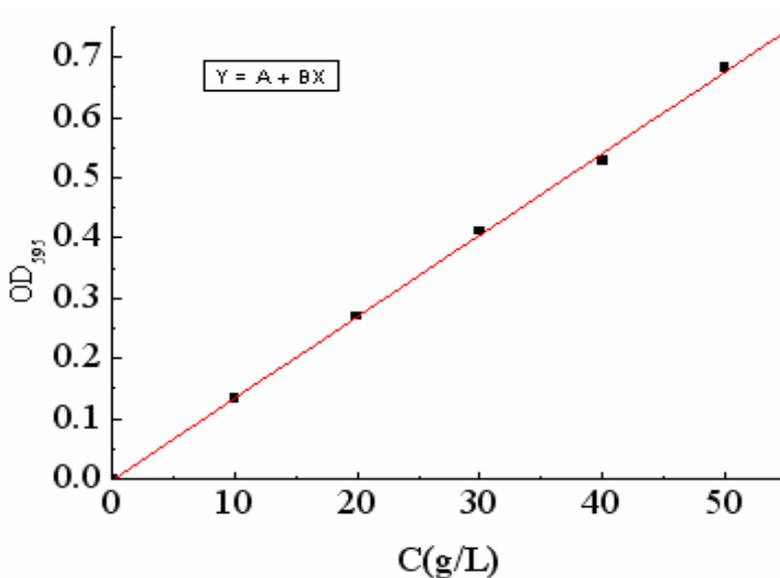


图3-1 Bradford法蛋白质浓度测定BSA标准曲线

Figure 3-1. BSA standard curve of protein concentration determined by Bradford assay

其中，蛋白质浓度计算公式为： $Y=A+B \cdot X$ ，

$$A=-6.66667 \times 10^{-4}; B=0.01353$$

### 3.3 SDS-PAGE 结果

SDS-PAGE 仅根据蛋白分子量亚基的不同而分离蛋白，这个技术 1967 年由 Shapiro 建立，他们发现在样品介质和丙烯酰胺凝胶中加入离子去污剂和强还原剂后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基分子量的大小，电荷因素可以忽视。图 3-2 为 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白用一维 SDS-PAGE 分离后得到的效果图。

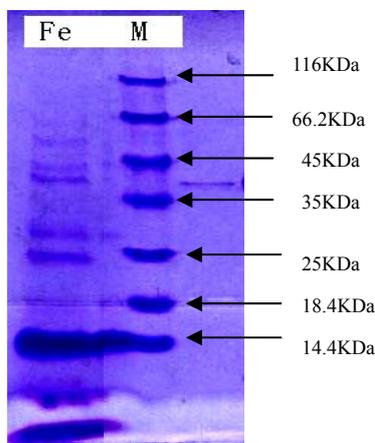


图 3-2 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fe 表示硫酸亚铁培养条件下提取的蛋白， M 表示蛋白标记；

Figure 3-2. Cell wall related proteins of *A. ferrooxidans* separated by SDS-PAGE

Fe, Proteins of *A. ferrooxidans* cultured in  $\text{Fe}^{2+}$ ; S, Proteins of *A. ferrooxidans* cultured in S

### 3.4 LC-MS/MS 分析

通过2-DE胶鉴定的蛋白大多是丰度较高的蛋白，低丰度蛋白和疏水性很强的蛋白(如膜蛋白)则很难通过2-DE胶得到有效的分离<sup>[61]</sup>。虽然采取一些方法如改变变性剂的浓度可以提高膜蛋白的溶解度或者采取分步抽提的方法富集蛋白可以克服一些缺陷，但这需要比较多的样品量。因而本研究中使用液相色谱-串联质谱技术，对蛋白进行分离鉴定。*A. ferrooxidans*细胞壁相关蛋白中包含一部分膜蛋白质，膜蛋白质在一般的2-DE裂解液中不容易溶解，并且在等电聚焦时容易在其等电点附近沉淀<sup>[39]</sup>。为了避免这个问题，先直接对提取蛋白质进行SDS-PAGE电泳，上样量为50 ug，然后将上面的SDS-PAGE条带从上到下均匀分为7段，胶内酶解后产物经由液相色谱分离，20 mmol/L乙酸铵洗脱。图3-3为20 mmol/L乙酸铵洗脱的胰蛋白酶酶解*A. ferrooxidans*细胞壁相关蛋白的色谱总离子谱图(TIC)。

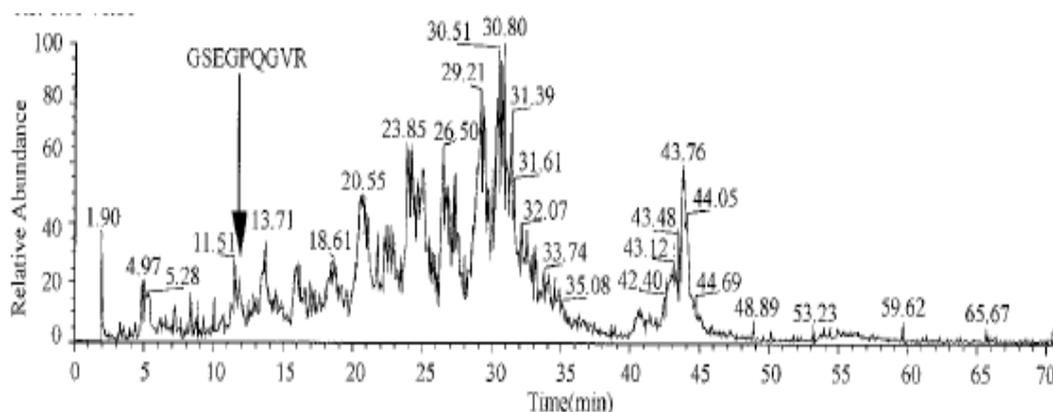


图 3-3 20 mmol/L 乙酸铵洗脱的液质联用分析色谱总离子谱图

Figure 3-3. Total ion chromatograms (TIC) of tryptic digest of cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* removed by 20mmol/L  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

LC-MS/MS技术已广泛应用于生物样品(药物及其代谢产物)和生物大分子(肽、蛋白、核酸和多糖)的分析，色谱根据保留时间将化合物分离，质谱会按化合物自身特有的碎裂规律分裂，生成一系列确定组成的碎片离子，将所有不同质量的离子和各离子的多少按质荷比记录下来，就得到一张质谱图。酶解产物肽混合物经CaPLC洗脱后，肽片段进入质谱离子源后进行一级质谱，进而进入二级质谱。图3-4为46.3 min洗脱时洗脱下的肽段915.27<sup>2+</sup>的PMF，共检出20条肽谱峰。

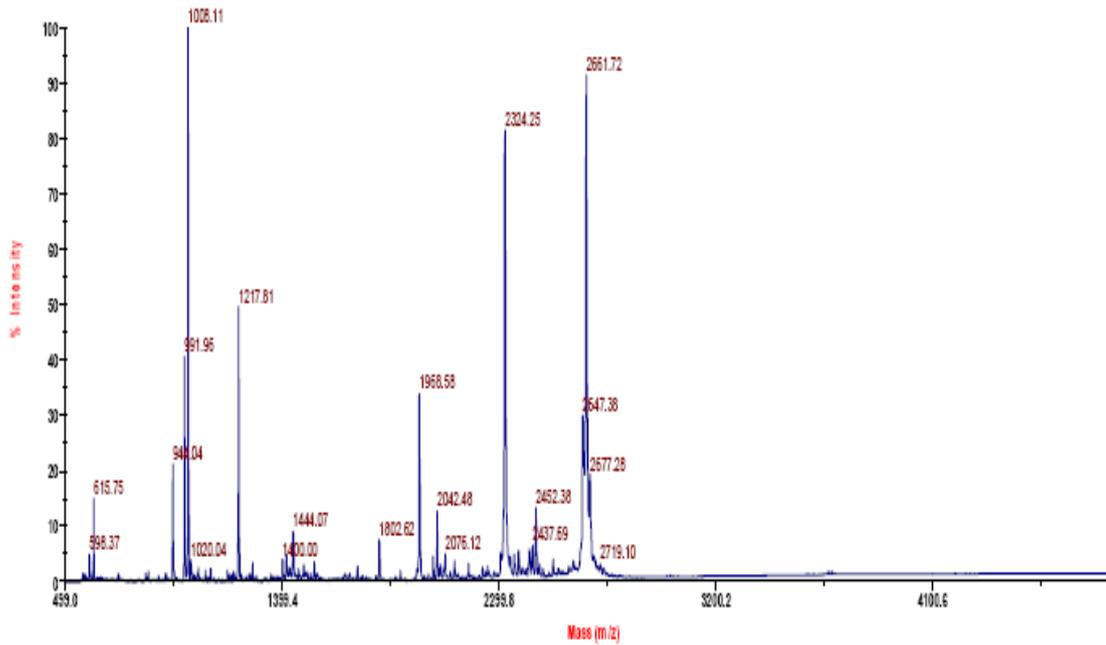


图 3-4 46.3 min 洗脱下的肽片段的一级质谱图

Figure 3-4. The MS survey scan during LC-MS/MS at time of 46.3 min

### 3.5 *A. ferrooxidans* 肽质量指纹图谱的构建及蛋白质鉴定

由于在相同实验条件下每种化合物都有其确定的质谱图,因此将所得谱图与已知谱图对照,就可确定待测化合物。质谱仪检测获得蛋白的肽质量指纹谱,利用ExPASy中的Peptide查询软件搜索SWISS-PROT以及NCBI数据库鉴定蛋白质的种类, Mscot软件是最常用的检索工具,其工作界面见图3-5,设定参数为:固定修饰为carbamoylmethylation (Cys),蛋白酶为胰蛋白酶,允许最大未酶切位点(missed cleavages)数为1,肽段质量容忍误差( $M_r$  tolerance)为1.0,碎片离子的质量容忍误差为0.5,置信度阈值(significance threshold)  $P < 0.05$ 。

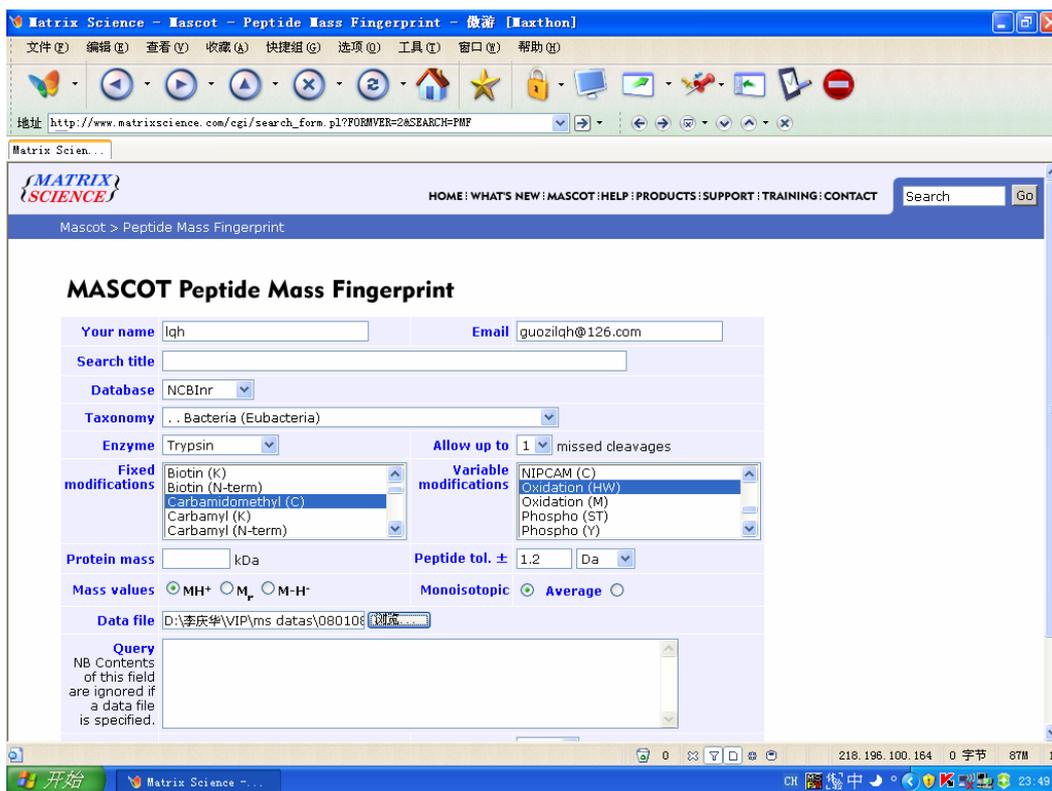


图 3-5 Mascot 软件数据库检索界面

Figure 3-5. Wet page of Mascot software searching in databases

肽质量指纹图谱是蛋白质组研究中最重要蛋白鉴定手段之一，将质谱鉴定所得的 PMF 数据于 Mascot 软件检索相应的数据库。在实际检索中出现了很好 PMF 图谱但查不到结果的情况，或检索到的结果为小鼠、小鸡等的蛋白，而非 *A. ferrooxidans* 的蛋白质。这种未检测到的蛋白可能是未知蛋白，但也可能使现有的 SWISS-PROT、NCBI 等数据中 *A. ferrooxidans* 蛋白质的 PMF 数据库还不全。如图 3-6 为检索到的 [Q72AR1\\_DESVH](#), Iron-sulfur cluster-binding protein。此蛋白属于 *Desulfovibrio vulgaris* (strain Hildenborough/ATCC 29579/NCIMB 8303)，而非 *A. ferrooxidans*。

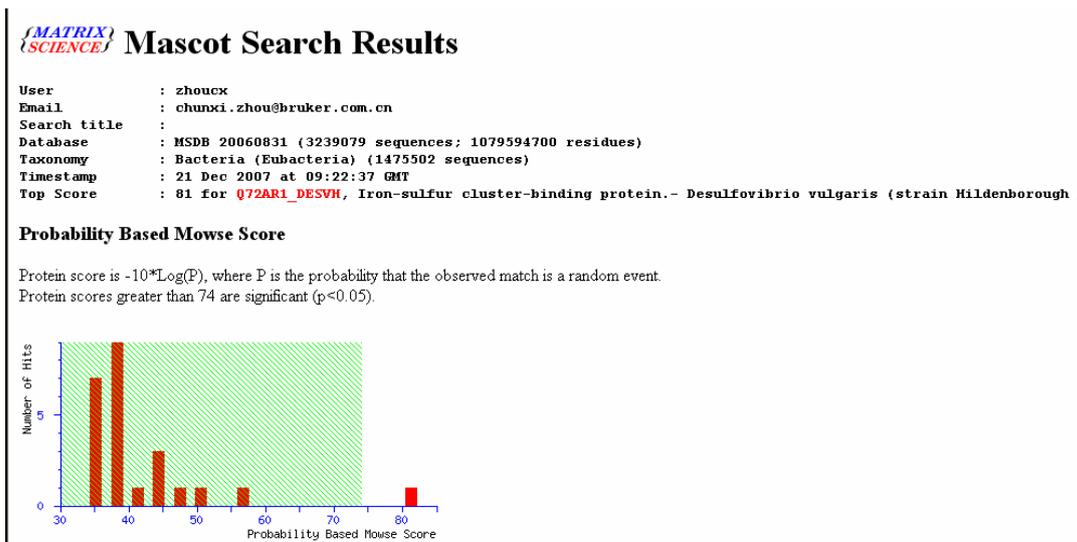


图 3-6 NCBI 数据库( NCBI )检索结果: [Q72AR1\\_DESVH](#), Iron-sulfur cluster-binding protein  
 Figure 3-6. Mascot Search Results searched in database ( NCBI ) : [Q72AR1\\_DESVH](#),  
 Iron-sulfur cluster-binding protein

为了解决数据库中 *A. ferrooxidans* 蛋白质的 PMF 数据不全的问题, 我们利用生物信息学技术模拟构建 *A. ferrooxidans* 蛋白质的 PMF 数据库, 以解决数据库不健全导致的蛋白质鉴定工作困难的问题。在构建好的 PMF 数据库中检索的结果表明, 此数据库与所得肽质量指纹谱有很好的匹配结果。下面两个图 (3-7, 3-8) 为同一肽段混合物在 AFE 数据库中的检索结果, 每个肽段混合物中都能检索到多个蛋白, 且匹配分值较高。

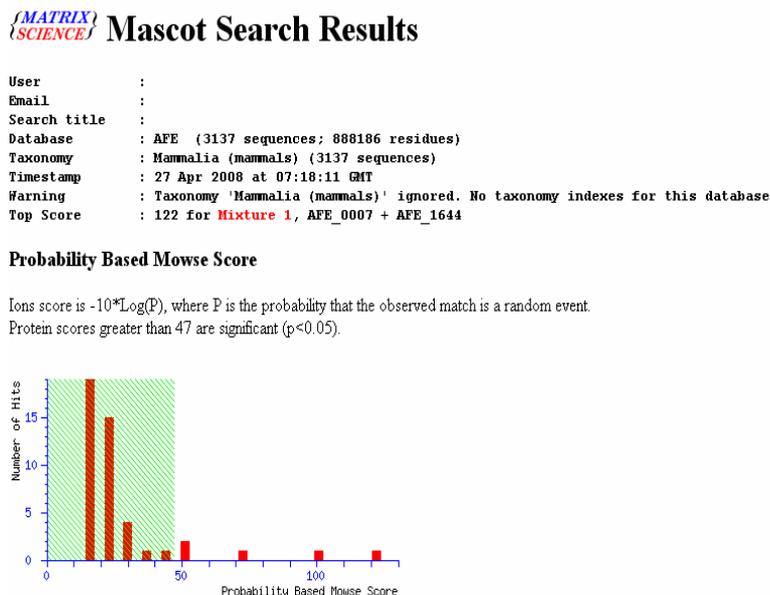


图 3-7 AFE 数据库检索结果 1  
 Figure 3-7. Mascot Search Results searched in the local putative *A. ferrooxidans*

protein database AFE (1)

|   |  |                         |                       |                                    |
|---|--|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1.  | <b>Mixture 1</b>   | <b>Total score: 122</b> | <b>Expect: 2e-009</b> | <b>Queries matched: 16</b>         |
| Components (only one family member shown for each component): |  |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_0007</a>   | Mass: 29154             | Score: <b>71</b>      | Expect: 0.00027 Queries matched: 9 |
|   | oxidoreductase, short-chain dehydrogenase-reductase family { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270} |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_1644</a>   | Mass: 26555             | Score: <b>53</b>      | Expect: 0.017 Queries matched: 7   |
|   | phosphate transport system protein PhoU (phoU) { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}             |                         |                       |                                    |
| 2.  | <b>Mixture 2</b>   | <b>Total score: 102</b> | <b>Expect: 2e-007</b> | <b>Queries matched: 14</b>         |
| Components (only one family member shown for each component): |  |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_1644</a>   | Mass: 26555             | Score: <b>53</b>      | Expect: 0.017 Queries matched: 7   |
|   | phosphate transport system protein PhoU (phoU) { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}             |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_2309</a>   | Mass: 44951             | Score: <b>51</b>      | Expect: 0.023 Queries matched: 7   |
|   | deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase, putative { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}   |                         |                       |                                    |
| 3.  | <a href="#">AFE_0007</a>   | Mass: 29154             | Score: <b>71</b>      | Expect: 0.00027 Queries matched: 9 |
|   | oxidoreductase, short-chain dehydrogenase-reductase family { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270} |                         |                       |                                    |
| 4.  | <a href="#">AFE_1644</a>   | Mass: 26555             | Score: <b>53</b>      | Expect: 0.017 Queries matched: 7   |
|   | phosphate transport system protein PhoU (phoU) { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}             |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_2155</a>   | Mass: 6411              | Score: 18             | Expect: 45 Queries matched: 2      |
|   | hypothetical protein { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}                                       |                         |                       |                                    |
|   | <a href="#">AFE_1368</a>   | Mass: 11151             | Score: 17             | Expect: 67 Queries matched: 2      |
|   | hypothetical protein { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270}                                       |                         |                       |                                    |

图 3-8 AFE 数据库检索结果 2

Figure 3-8. Mascot Search Results searched in the local putative *A. ferrooxidans* protein database AFE (2)

将获得的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白质的 245 肽质量指纹图谱在 AFE 数据库中检索，进行蛋白鉴定，同时还得到肽段得分，匹配序列，该蛋白在蛋白序列中的基因座位 (Locus)，在这里仅列出部分已检索到的蛋白。

[AFE\\_2957](#)

Mass: 44829 Score: **256** Expect: 7.9e-023 Queries matched: 22

tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (tolB) {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_1188](#)

Mass: 22934 Score: **47** Expect: 0.057 Queries matched: 6

superoxide dismutase (sod) [1.15.1.1] {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_1293](#)

Mass: 47660 Score: **126** Expect: 7.9e-010 Queries matched: 13

sulfide-quinone reductase, putative {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_1644](#)

Mass: 26555 Score: **53** Expect: 0.017 Queries matched: 7

phosphate transport system protein PhoU (phoU) {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_0343](#)

Mass: 44951 Score: **51** Expect: 0.023 Queries matched: 7

outer membrane lipoprotein LolB, putative {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2309](#)

**Mass:** 44951 **Score:** 51 **Expect:** 0.023 **Queries matched:** 7

deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase, putative {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2502](#)

**Mass:** 32731 **Score:** 137 **Expect:** 6.3e-011 **Queries** **matched:** 20

phosphoribulokinase (cbbP) [2.7.1.19] {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2974](#)

**Mass:** 29631 **Score:** 99 **Expect:** 4.3e-007 **Queries matched:** 11

Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein {*Acidithiobacillus ferrooxidans*}

[AFE\\_2047](#)

**Mass:** 43743 **Score:** 44 **Expect:** 0.12 **Queries matched:** 6

hypothetical protein {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2887](#)

**Mass:** 10669 **Score:** 67 **Expect:** 0.00066 **Queries matched:** 8

LPS heptosyltransferase II {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2510](#)

**Mass:** 16574 **Score:** 144 **Expect:** 1.2e-011 **Queries matched:** 12

conserved hypothetical protein {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2545](#)

**Mass:** 19182 **Score:** 157 **Expect:** 6.3e-013 **Queries matched:** 14

inorganic pyrophosphatase (ppa) [3.6.1.1] {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_0025](#)

**Mass:** 29871 **Score:** 175 **Expect:** 9.9e-015 **Queries matched:** 12

membrane protein, putative {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

[AFE\\_2136](#)

**Mass:** 19936 **Score:** 54 **Expect:** 0.013 **Queries matched:** 6

orotate phosphoribosyltransferase (pyrE) [2.4.2.10] {*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270}

.....

由于冰冻雪灾造成学校停电，致使仪器故障，目前仅得到 112 个检索结果。

### 3.6 序列分析

目前，对细胞壁蛋白的提取还没有一个公认的十分合理的方法，要做到一点杂蛋白污染都没有是很困难的事。因此，我们对每个蛋白进行定位分析。一般认为，蛋白质定位的信息存在于该蛋白质自身结构中，通过与膜上受体的相互作用得以识别，这就是信号肽假说的基础。该假说认为，跨膜蛋白起始密码子后，有一段编码疏水氨基酸序列的RNA片段，这个氨基酸序列就称为信号肽(signal peptide)，新合成的蛋白质通过该信号肽的识别进入到正常的分泌途径。这一假说已经得到大量试验证据的证明，这为我们采用生物信息学分析该物种氨基酸序列是否具有分泌信号肽、以及是否属于分泌蛋白提供了依据<sup>[75]</sup>。

对检索到的每一个蛋白，根据其Locus在已注释的基因库中(<http://www.tigr.org>)查找其相应开放阅读框，利用一下软件对每个蛋白进行分析：

SignalP v3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)软件<sup>[76,83]</sup>对该物种氨基酸序列是否具有信号肽进行分析；

TatP 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>)软件<sup>[77]</sup>对蛋白序列是否具有Tat (twin-arginine translocation)信号肽进行分析；

LipoP 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) 软件<sup>[78]</sup>对蛋白序列是否具有Lipo信号肽进行分析；

SecretomeP 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) 软件<sup>[82]</sup>对序列非经典分泌蛋白进行分析。

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件<sup>[79]</sup>和THUMBUP (<http://theory.med.buffalo.edu/soft-wares-services-files/thumbup.htm>) 软件<sup>[80]</sup>对该序列的跨膜区进行分析；

Big-PI Predictor ([http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/gpi\\_server](http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/gpi_server)) 软件<sup>[89~92]</sup>用于鉴定蛋白质的GPI锚定位点；

TargetP v1.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 软件<sup>[81]</sup>、

Subcell Specialization Server 2.5(<http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular>) 软件<sup>[85]</sup>、

CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 软件<sup>[86,87]</sup>及PSORTb v.2.0

(<http://www.psort.org/>) 软件<sup>[88]</sup>预测靶标肽段在亚细胞器中的分布和定位,进一步确定该信号序列是否为穿膜信号肽。

然后根据TIGR基因注释对其功能进行分类。此外，还利用compute PI/MW

([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 工具<sup>[84]</sup>计算其等电点与分子量(此数据本来在PMF数据库检索就能得到，鉴于客观因素，只能重新计算)。

### 1、蛋白质信号肽分析

SignalP V3.0预测结果根据标准 $L = -918.235 - 123.455 \times (\text{Mean S score}) + 1983.44 \times (\text{HMM score})$ 进行判定。当 $L > 0$ ，且没有GPI-锚定的位点(no GPI-anchor sites)、无跨膜区(no transmembrane domains, TM)、没有锚定线粒体或其他胞内细胞器的信号(no targeting signal to subcellular location)，同时满足以上4个条件者为分泌蛋白。预测分析结果见图3-9。

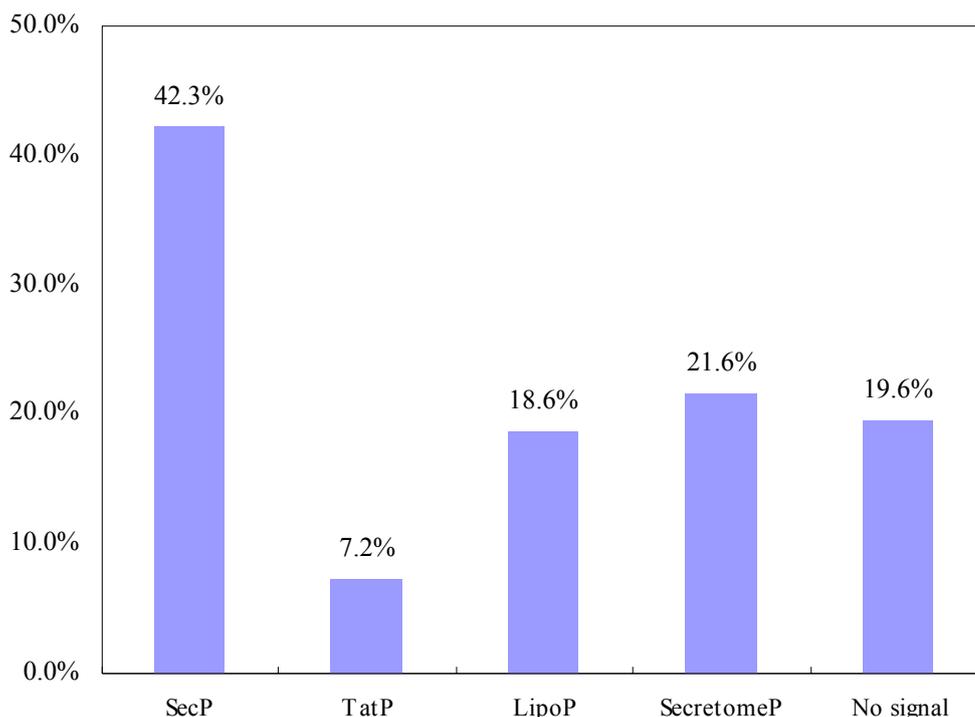


图 3-9 蛋白质信号肽分布图

Figure 3-9. Percent distribution of proteins according to their export signal

预测结果表明共有 97 个蛋白为目标，42.3%的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白都有 Sec-type 信号肽，Sec 系统是相当保守的分泌机制，在古菌、细菌及真核生物中都存在。Sec 系统既可用于蛋白的跨膜运输，也可用于膜蛋白的插入膜层。而 7.2%的蛋白是在 Tat 信号识别辅助因子的帮助下，转运到膜上的 Tat 移位机器，经折叠后被运输到细胞质膜外。18.6%的蛋白具有脂蛋白的信号肽，21.6%的蛋白为非经典分泌蛋白，它们通过非常规分泌途径分泌到细胞外。这些分泌蛋白中有 2 个蛋白 (AFE\_2974, AFE\_0801) 同时有 Sec-type 信号肽和 Tat 信号肽，有 5 个蛋白 (AFE\_1918、AFE\_0189、AFE\_0190、AFE\_0297、AFE\_0420) 同时 Sec-type 信号肽和 Lipo 信号肽。还有 19.6%的蛋白没有输出信号。这些没输出信号的蛋白按功能分类大多为细菌表面结构蛋白、肽聚糖的生物合成与降解蛋白，如菌毛组装蛋白 (pilus assembly protein)、菌毛素信号序列域蛋白 (pilin signal sequence

domain protein)、外膜引导蛋白(outer membrane usher protein)、杆状决定蛋白(rod shape-determining protein)、周质空间葡聚糖生物合成蛋白(periplasmic glucans biosynthesis protein)等。虽然没有输出信号,但是根据其亚细胞定位预测,都位于胞外、周质空间、外膜上,也可以认为是细胞壁相关蛋白。

## 2、蛋白质功能分类

根据 TIGR 基因库中蛋白功能注释,将上述目标蛋白(97 个蛋白)按蛋白功能进行分类,见图 3-10。

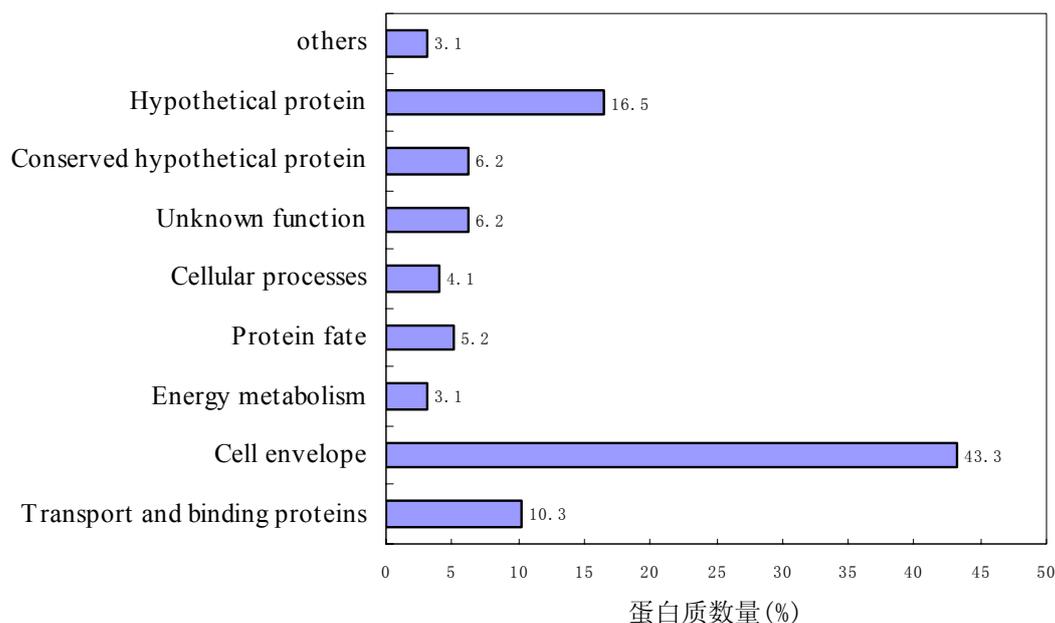


图 3-10 根据 TIGR 注释蛋白质功能分类图

Figure 3-10. Distribution of cell wall proteins in functional categories according to TIGR annotation

从上图可以看出,有四分之一以上(43.3%)的蛋白质为 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 细胞包被(Cell envelope)蛋白,其中 54.8%的蛋白为表面结构(Surface structures)蛋白,21.2%的蛋白为胞壁质和肽聚糖的生物合成与降解(Biosynthesis and degradation of murein sacculus and peptidoglycan)和表面多聚糖和脂多糖的生物合成与降解(Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides),其余 35.7%为其他的细胞包被蛋白。16.5%的蛋白为假设蛋白(Hypothetical protein),10.3%的蛋白为转运与结合蛋白(Transport and binding proteins),6.2%的蛋白为保守的假设蛋白(Conserved hypothetical protein),还有 6.2%蛋白为未知蛋白(Unknown function),其他功能的蛋白含量都很少。

## 3、等电点及分子量分析

将上述蛋白的分子量及等电点进行统计分析,结果见图 3-11。

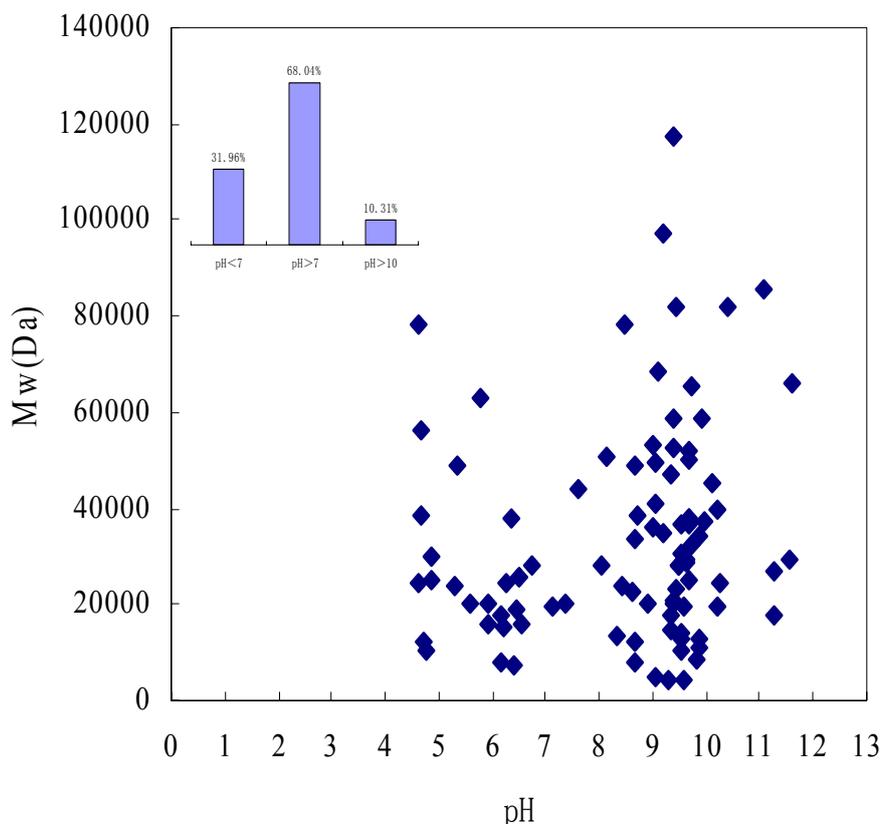


图 3-11 蛋白质等电点/分子量分布图

Figure 3-11. Distribution of cell wall related protein according to their theoretical isoelectric points and molecular masses

从上图可以看出, *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白质的 pH 主要分布在 4~12 之间。31.96%的蛋白质的 pH 小于 7, 68.04%的蛋白质 pH 大于 7, 10.31%的蛋白质 pH 大于 10, 偏碱性蛋白多些, 这可能与 *A. ferrooxidans* 适应酸性环境有关<sup>[74]</sup>。据报道, *A. ferrooxidans* 周质空间的 pH 在 2.5~3.0 范围<sup>[74]</sup>。因此, 可以认为, 这些蛋白是耐酸或者说酸稳定的。而分子量主要分布在 4000~118000Da。

### 3.7 讨论

目前的研究中, 细胞壁相关蛋白的提取物中没有一个污染蛋白是比较困难的, 但是我们可以通过分别对应于细胞壁、胞内蛋白的特异性抗体采用west blotting的方法来验证提取的蛋白, 也可以通过测一些酶的活性来确定所提蛋白的纯度; 同时, 在鉴定出蛋白的基础上, 可以进一步采用生物信息学的方法来预测蛋白所处的位置(是胞内还是胞外)。对于认为功能重要的蛋白还可以通过基因敲除、基因沉默、免疫电镜等技术来定位蛋白在表达修饰后最终定位在细胞的什

么位置。本研究中才用生物信息学的方法对每一个蛋白所处的位置进行预测, 获得较满意的结果。同时我们也从细胞壁片段中检测到位于胞内的蛋白质, 例如 EF-Tu, carboxy- some shell components, subunits of ribulosebisphosphate carboxylase, and some ribosomal protein。我们把这归因于细胞裂解过程中胞内蛋白的溢出。然而, 一些ribosomal proteins存在的原因还不清楚<sup>[67]</sup>, chaperone DnaK, the chaperonin GroEl, superoxide dismutase, EF-Tu and some ribosomal proteins作为非典型分泌蛋白在G<sup>+</sup>细菌中也被发现。因此, 细胞定位还有待于进一步分类<sup>[68]</sup>。

液相色谱-串联质谱联用是分离鉴定蛋白质, 尤其是疏水性较强的蛋白质的有效方法。本实验中, 在SCX柱和反相分析柱之间有一反相填料的预柱, 所以能将干扰酶解肽片段分离和离子化的SDS和CHAPS等去除并起到浓缩肽段的作用。且使用质谱串联对分离的蛋白进行2次分析, 大大提高了精确度。

每个蛋白质经过酶解成为长短不一的肽段后, 同一时间获得所有肽段分子质量, 形成一个肽段分子质量图谱, 这个图谱对蛋白质应该是专一的, 特异的, 因此称为肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)。这一方法, 不需对图谱进行人工解析, 只需将实验获得的PMF与蛋白质数据库中蛋白质的理论PMF比对, 就可以鉴定该蛋白质。因此比传统方法速度快、通量高, 是最早用于大规模蛋白质鉴定的质谱方法, 也是目前最简便的蛋白质鉴定方法之一。尤其近年来随着蛋白质数据库或由基因组数据库衍生的蛋白质数据库的快速增长和完善, 使PMF方法的适用性大大增强<sup>[40, 41, 42]</sup>。

但是, PMF法也同样受到一些限制, 影响PMF法鉴定结果的关键因素主要为:

(1)、灵敏度, 能否灵敏地获得PMF信号是任何后续分析的基础。灵敏度的欠缺会造成信噪比高, 在一定程度上又影响到精确度。另外, 可检测到的肽段少, 对数据库检索是不利的。

(2)、精确度, PMF方法主要是靠对肽段的分子质量测定获得准确的检索结果, 因此分子质量精确度是最重要的指标。目前质谱分析的分子质量精确度可达 $5 \times 10^{-6}$ 左右, 已经完全符合数据库检索的要求。但是在实际工作中, 尤其是微量样品, 或从胶内酶解获得的样品, 精确度往往不够理想, 会很大程度上影响检索结果, 误差越大, 检索准确性越低。

(3)、质量校正, 鉴于精确度对PMF结果的决定作用, 质量校正实验中必不可少的一步, 尤其对TOF质量分析器, 质量校正是非常重要而且需常规进行的。质量校正有外标和内标校正两种。内标校正比外标校正要精确, 不过标准品掺入的步骤较繁琐, 标准品浓度若太高, 反而会将样品信号抑制, 但如果控制的好, 对PMF的精确度还是很有帮助的。

- (4)、分辨率，分辨率一定程度上与精确度是相关的，分辨率下降，就会导致峰宽，精确度也下降了。
- (5)、数据库，由于PMF鉴定蛋白质是依赖数据库的，因此数据库本身是否完善和准确也是关键因素之一。实际工作中经常会出现PMF图谱很好，但查不到结果的情况。原因之一就是数据库不全，实验的蛋白质在数据库中不存在，即可能是未知蛋白质。目前已有的蛋白质数据库中，以本文中的NCBI数据库最完善，但在大部分真核生物中，即使基因组序列已知，由于有内含子、翻译后修饰等因素影响，蛋白质数据库仍不完善，是制约质谱法鉴定蛋白质的一个瓶颈。
- (6)、样品制备，可影响PMF法鉴定蛋白质的结果的人为因素主要是样品制备。样品制备的好坏会直接影响到图谱的灵敏、精确度和分辨率。
- (7)、检索方法和工具，如何对PMF的实验结果和理论图谱进行比较和评价，是将实验数据转换成具有生物学意义的结果的关键。蛋白质组的研究要求有自动化处理大规模数据的工具，从而促使生物信息学迅速发展。目前许多与蛋白质组相关的软件可通过与EXPASY蛋白质组学服务器链接 ([www.expasy.ch/www/tools.html](http://www.expasy.ch/www/tools.html))，这些软件可用于鉴定蛋白质的种类，分析蛋白质的理化性质，预测可能的翻译后修饰以及蛋白质的三维结构，其中注释蛋白质和二维凝胶电泳数据库是蛋白质组研究的生物信息学核心<sup>[43,44]</sup>。常用的软件及其介绍见表3-1。

表3-2 PMF常用软件

Table 3-1. Softwares for PMF in common use.

| 软件名称              | 网址                    |
|-------------------|-----------------------|
| Mascot            | www.matrixscience.com |
| Profound          | Prowl.rockefeller.edu |
| PeptIdent         | www.expasy.ch/tools   |
| ProteinProspector | Prospector.ucsf.edu   |
| PepSea            | 195.41.108.38         |

肽质量指纹图谱分析的成功依赖于检测到有代表性的肽段质量以及所研究的蛋白质为已知蛋白质（也就是说蛋白质数据库中有其序列）。NCBI、EBI和日本都设有可免费查询的结构域序列公共数据库，尽管这些组织间保持着广泛的信息交流，但是没有有一个严格的系统可确保任何一个数据是真正非冗余的，并包含所有已知的蛋白序列<sup>[62]</sup>。

### 3.8 本章小结

*A. ferrooxidans* 有 3137 个开放阅读框 (ORF)，编码 3137 个蛋白，依此构建的肽质量指纹图谱库 (AFE) 大大方便了实验中对蛋白质的鉴定。本实验通过 LC-MS/MS 技术获得 *A. ferrooxidans* 大多数细胞壁相关蛋白的 245 个肽质量指纹图谱，应用 Mascot 软件在 AFE 数据库中检索。鉴于实验条件，目前仅得到 97 种蛋白。这 97 个蛋白中 42.3% 有 Sec-type 信号肽，7.2% 具有双精氨酸转运信号肽，18.6% 的蛋白具有脂蛋白信号肽，21.6% 的蛋白为非经典分泌蛋白通过非常规分泌途径分泌到细胞外。亚细胞定位预测得知，这些蛋白主要位于周质空间 (Periplasmic)、外膜 (Outer Membrane)、胞外 (Extracellular) 或多位点，也有一些蛋白位于质膜上，但是 PSORTb 分析它们都含有 2~14 个  $\alpha$  螺旋，且检测到非胞内 (non-Cytoplasmic) 信号的存在，因此认为这些蛋白是一些跨质膜蛋白，其结构中有一些部位因位于周质空间而被提取出来。按 TIGR 中 *A. ferrooxidans* 基因注释，按功能分类 43.3% 的细胞壁相关蛋白质为细胞包被，其中 54.8% 的蛋白为表面结构蛋白，21.2% 的蛋白为胞壁质和肽聚糖的生物合成与降解和表面多糖和脂多糖的生物合成与降解，其余 35.7% 为其他的细胞包被蛋白。16.5% 的蛋白为假设蛋白，10.3% 的蛋白为转运与结合蛋白 (Transport and binding proteins)，6.2% 的蛋白为保守的假设蛋白，还有 6.2% 蛋白为功能未知蛋白，其他功能的蛋白含量都很少。这些蛋白质的 pH 主要分布在 4~12 之间，31.96% 的蛋白质的 pH 小于 7，68.04% 的蛋白质 pH 大于 7，10.31% 的蛋白 pH 大于 10，偏碱性蛋白多些，这可能与 *A. ferrooxidans* 适应酸性环境有关。据报道，*A. ferrooxidans* 周质空间的 pH 在 2.5~3.0 范围。因此，可以认为，这些蛋白中位于周质空间的蛋白是耐酸或者是说酸稳定的。而分子量主要分布在 4000~118000Da。

## 第四章 不同培养条件下嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞壁相关蛋白表达差异

### 4.1 引言

在浸矿过程中，浸矿微生物面临着各种复杂的物理环境，同时也表现出不同的生理特性。K.Harneit 等人发现当 *A. ferrooxidans* 与矿物作用 10 h 后，黄铁矿上吸附了 90% 的细菌，而黄铜矿和闪锌矿上只有 60~75%，石英上面几乎没有吸附的细菌。傅建华等人研究发现外膜泡仅在以固体基质(S)为能源的培养基中才会形成。这些都说明，在微生物/矿物吸附过程中，浸矿微生物表现出不同的吸附特性。

本实验通过对硫酸亚铁和单质硫两个不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的提取、分离、分析及鉴定，寻找其表达差异蛋白，来揭示 *A. ferrooxidans* 在不同培养条件下的吸附差异。

### 4.2 两个不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白含量测定

在蛋白质 2-DE 分离前，要先对两个不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白定量，以便在 2-DE 中能够实现相同的上样量。同样用 Bradford 法测定蛋白质浓度。标准曲线见图 4-1。FeSO<sub>4</sub> 和 S 两个培养条件下的蛋白质浓度分别为 11.25 ug/uL，13.66 ug/uL。

### 4.3 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白 SDS-PAGE 结果

一般，在 2-DE 分离前蛋白质要经过 SDS-PAGE 初步鉴定，为后面实验做好充分的准备。SDS-PAGE 电泳图如图 4-1。

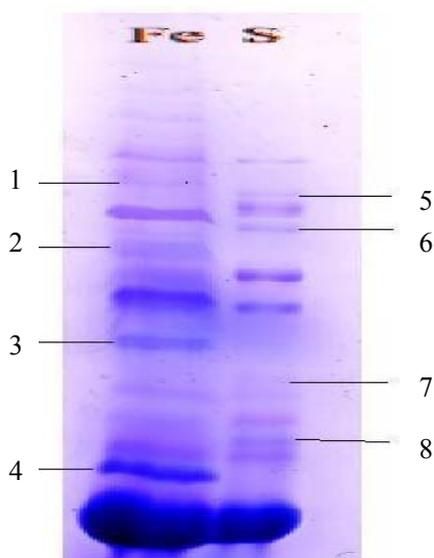


图 4-1 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白 SDS-PAGE 图  
 Fe 表示硫酸亚铁培养 S 表示单质硫培养  
 ——处表示差异条带

Figure 4-1. Cell wall related proteins separated by SDS-PAGE from *A. ferrooxidans* which was cultured in different conditions

Fe, Cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in  $\text{Fe}^{2+}$ ;

S, Cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in S.

——, The different band.

SDS-PAGE 是根据蛋白质分子量大小将混合蛋白质分离，从图 4-1 可以看出经过初步的分离两个不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白就有明显的 8 个差异条带，这说明这些蛋白质存在着较大的差异。

#### 4.4 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白 2-DE 结果

对  $\text{FeSO}_4$  和单质硫为能源两个条件下培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白进行双向电泳分离，并多次重复进行，双向电泳图谱表现出了良好的重复性，不同能源培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的双向电泳如图 4-2。

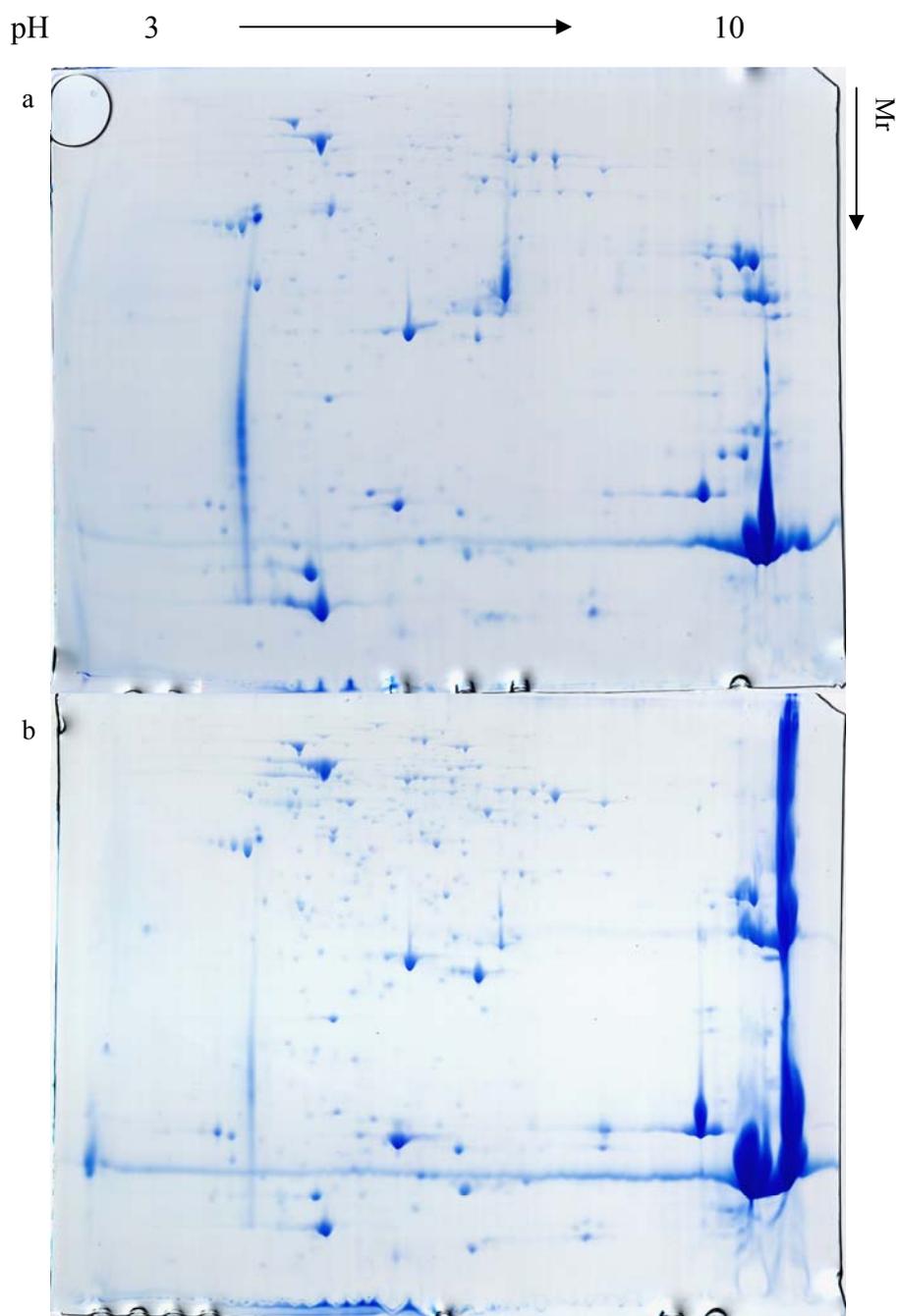


图 4-2 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图谱

- (a) 以单质 S 为能源 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱,  
(b) 以  $\text{Fe}^{2+}$  为能源 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱.

Figure 4-2. Cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* separated by 2-DE

- a. Cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in  $\text{Fe}^{2+}$ ;  
b. Cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in S.

从图上可以看出, 以  $\text{Fe}^{2+}$  为能源和单质硫培养 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白质都主要集中在 pH4~10 的范围内, 且在 pH10 处有一个很粗的条带, 这可能是有些 pH 大于 10 的蛋白没有被分离开有关, 这与前面的实验结果也是相符和

的。从图上还可以看出  $\text{Fe}^{2+}$  为能源的 *A. ferrooxidans* 比单质硫为能源的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白质表达要多。我们采用 PDQuest 2-DE 分析软件对 2-DE 图谱进一步分析, 确定每一个差异表达蛋白。

#### 4.5 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白 2-DE 结果分析

PDQuest 2-DE 分析软件系统和其它 2-DE 分析软件系统一样, 也包括图像采集、图像加工、斑点识别及蛋白质斑点的数据采集等。采集的原始图像经过加工, 滤掉一部分背景及去除部分水平和垂直条纹, PDQuest 2-DE 分析软件采用高斯平滑(Gaussian smooth)、增强背景等方法, 选择合适的参数获得了清晰度较高的图谱。

选用不同的域值如“最大点”、“最小点”、“最弱点”、“背景框”及灵敏度等, 对图 4-3 中的蛋白质点进行了识别(如图 4-3)得到了斑点大小、形状、位置与肉眼观察到的斑点较为接近的 Gel Image 图谱。自动检测完毕后, 仍有一些点未被识别出, 还有些可能是假点, 另有些因距离过近被识别成一个点, 所以还需手工对一些点进行添加、删除或分割等处理。由于扫描后的图像一般都有不同程度的背景, 会影响蛋白质斑点的精确检验, 故在点检测完成后需消减背景, 图 4-4 为 *A. ferrooxidans* 蛋白质双向凝胶电泳点检测后消除背景的图谱。我们通过 Gel Image 对 *A. ferrooxidans* 双向凝胶电泳图谱上经过软件数字化处理的斑点进行了识别, 获得了 232 士 15 个蛋白点。数字化斑点的进一步配比则须用 Gel Spot 来处理。在 Gel Spot 上可进行等电点与分子量匹配、标记、不同 Gel Spot 之间的匹配等等。通过图谱的初步对比, 可以获得二者的差异图谱(图 4-5)。图中红色圆圈里的点是二者不能匹配的蛋白质斑点, 也即是差异点, 差异包括量上的差异和有无的差异。

在蛋白质斑点检测和消减背景的基础上进行 2-DE 凝胶图像之间的匹配。PDQuest 分析软件必须先指定一个 2-DE 凝胶图像作为参考胶(Gaussian Gel)。PDQuest 为图像匹配提供了多种匹配方式, 包括自动匹配和手动匹配。由于电泳过程中一些因素的影响, 即使是同一样品两次电泳图像之间也存在移位或扭曲, 在这种条件下可调整上述两个参数得到比较好的匹配效果。另外可采用手工辅助匹配, 即先手工设定一些相互匹配的蛋白质斑点, 匹配时其它蛋白质斑点便会自动依据手工设定的种子进行校正从而有助于精确的 2-DE 凝胶图像的匹配, 接着确定其它匹配参数以完成整个匹配过程。

PDQUEST 为匹配结果分析提供了多种方式。例如某个蛋白质斑点在不同 2-DE 凝胶图像上有表达量的差异, Image Master 既可用数字精确具体的反映, 也能够用图像的形式进行直观的表达。

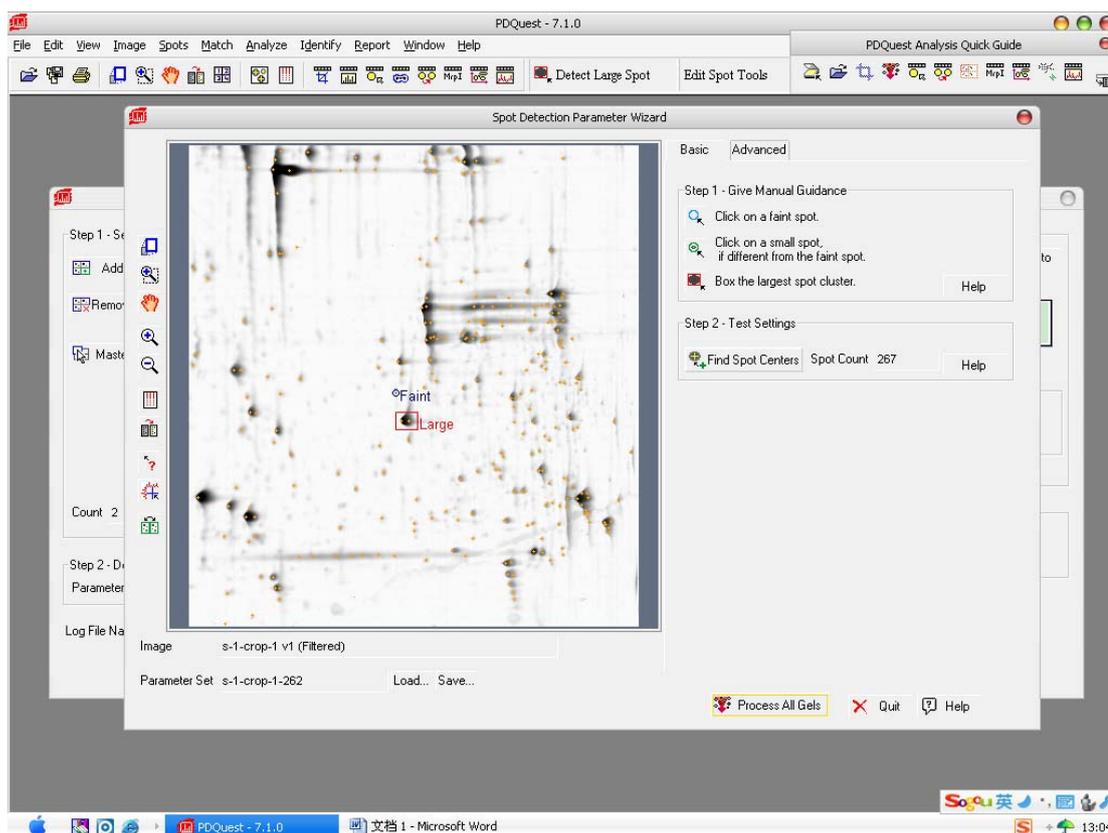


图 4-3 利用 PDQUEST 软件的 Spot Detection Wizard 界面进行蛋白质斑点检测窗口

Figure 4-3. Windows of Spot Detection Wizard of PDQuest software

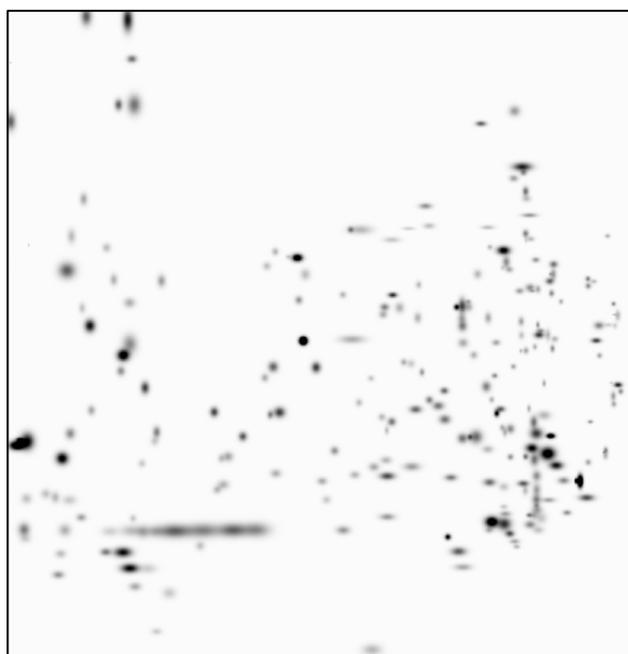


图 4-4 滤掉一部分背景及去除部分水平和垂直条纹的电泳图

Figure 4-4. Viewer of the image filtered some backgrounds and tripes

#### 4.6 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白重复组蛋白质点一致性分析

蛋白质组双向电泳分离技术是受多种因素影响的多步骤实验,为了获得较高重复性、可比性和稳定性的 2-DE 图谱,每个培养条件我们都做了 3 组以上的平行,我们选取 3 张电泳图用 PDQuest 软件对其蛋白点一致性进行分析。图 4-5 为 S 培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关的蛋白 3 次双向电泳结果的一致性分析。



图 4-5 S 培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关的蛋白一致性分析

a. 为 Master 胶;                    b. 为 11.06 双向电泳胶;  
c. 为 12.16 双向电泳胶;        d. 为 11.23 双向电泳胶;

Figure 4-5. Group Consensus of cell wall related roteins from *A. ferrooxidans* cultured in S by the PDQuest software

a. Master gel;    b. 2-DE gel of 11.06;    c. 2-DE gel of 12.16;    d. 2-DE gel of 11.23.

从三块凝胶上分别检测到蛋白点 208、232、213 个,以 11.06 胶为 Master 胶,其他两块胶的 Match Rate 1 分别为 94%、98%, Match Rate 2 分别为 85%、90%。Match Rate 1 表示匹配蛋白点占凝胶上所有点的百分比,Match Rate 2 表示

匹配蛋白占 Master 胶上全部点的百分比。以同样的方法分析 Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白，其匹配率达 90%以上，说明本实验有较好的重复性。

#### 4.7 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白差异分析

用 PDQuest 软件分析不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图上的差异蛋白点，以 Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的双向电泳凝胶为 Master 胶，将两块胶进行匹配，结果见图 4-6，4-7。

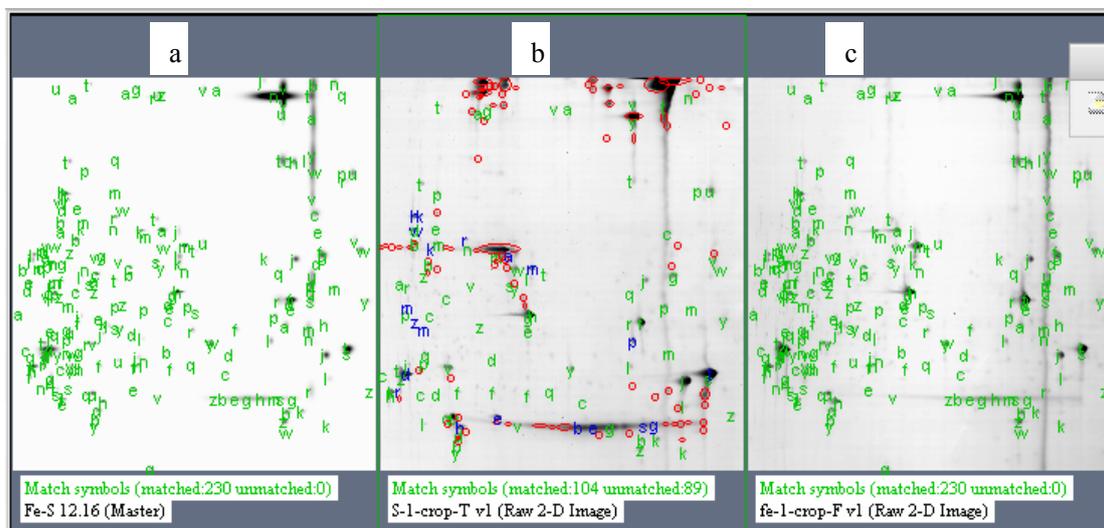


图 4-6 图 12.16 胶上蛋白点差异分析

Figure 4-6. Analysis of different proteins by the PDQuest software

- a. 为 Master 胶;
- b. Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳胶;
- c. S 培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳胶;

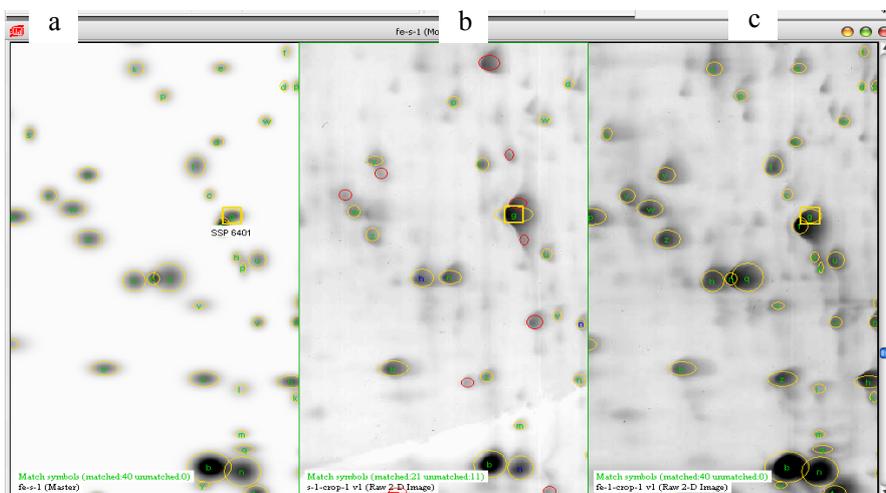


图 4-7 12.16 胶上蛋白点差异分析

- a. 为 Master 胶;
- b.  $\text{Fe}^{2+}$  培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图;
- c. S 培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图。

Figure 4-7. Analysis of different proteins in gel 12.16

- a. MASter gel;
- b. 2-DE gel of cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in  $\text{Fe}^{2+}$ ;
- c. 2-DE gel of cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in S.

红色圆圈里的点是二者不能匹配的蛋白质斑点，也即是差异点。在相同上样量的情况下，蛋白质的差异包括量上的差异和有无的差异。图 4-8、4-9 分别为 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达与否与表达量的差异比较。

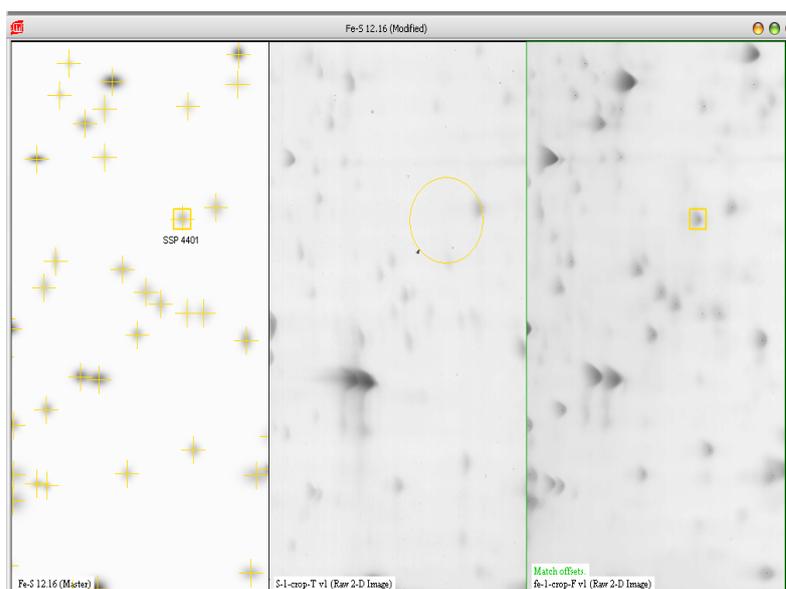
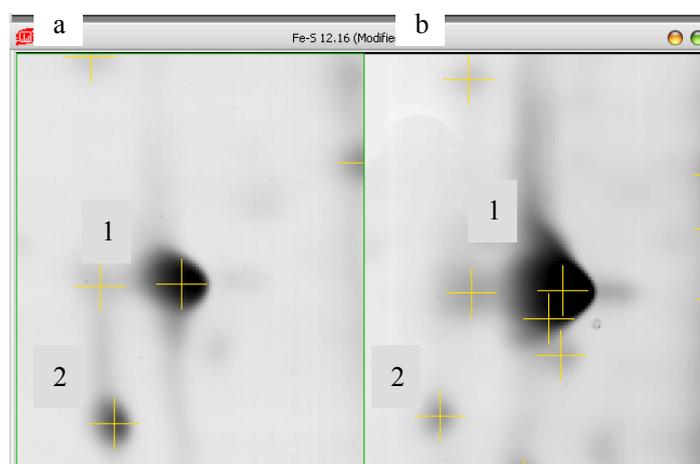
图 4-8 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达与否的差异Figure 4-8. Different well wall related proteins from *A. ferrooxidans* expressed or not in different cultures

图 4-9 不同培养条件下蛋白表达量的差异

Figure 4-9. Different proteins with different quantity in different cultures

- a. Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图;
- b. S 培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白双向电泳图.
- a. 2-DE gel of cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in Fe<sup>2+</sup>;
- b. 2-DE gel of cell wall related proteins from *A. ferrooxidans* cultured in S.

表 4-1 图 4-9 中两差异蛋白表达量差异

Table 4-1. The different quantity of the two different proteins in Figure 4-9

| 点号 | Fe <sup>2+</sup> 培养 | S 培养      | 平均比值 |
|----|---------------------|-----------|------|
| 1  | 2119.7±23           | 4663.1±38 | 0.45 |
| 2  | 958.3±23            | 406.5±8   | 2.36 |

附注: 平均比值为 Fe<sup>2+</sup>培养条件下蛋白表达量与 S 培养条件下蛋白表达量的比值。

Average ratio: Quantity ratio of expressed proteins in Fe<sup>2+</sup> and S cultures.

以相同的 2-DE 条件跑出来的两张电泳图为一个对比组, 都 Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白的双向电泳胶为 Master 胶, 进行 3 次匹配, 根据分析结果, 计算出 3 块胶的平均匹配率。

表 4-2 两块胶的匹配结果

Table 4-2. Matched spots in the two gels

| Gel name         | Spots | Match | Matched Rate 1 | Matched Rate 2 |
|------------------|-------|-------|----------------|----------------|
| Fe <sup>2+</sup> | 240   | 240   | 100%           | 100%           |
| S                | 219   | 126   | 57.5%          | 52.5%          |

从上表可以看出, Fe<sup>2+</sup>培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白有 240 个表达, 而培养条件下只有 219 个, 126 个蛋白是两种条件下都表达且标蛋量一致, Fe<sup>2+</sup>培养条件下比 S 培养条件下多表达 21 个蛋白。与 Fe<sup>2+</sup>培养的 *A. ferrooxidans* 相比, 在 S 上生长的 *A. ferrooxidans* 有 93 个差异细胞壁相关蛋白。

#### 4.8 不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白差异鉴定

无论是 LC-MS/MS 还是 MALDI-TOF-MS 都有自身的优缺点, 为了得到完整的细胞壁相关蛋白表达图谱, 实际研究中我们是讲两种方法结合起来, 对每一个蛋白进行分离鉴定。不同能源培养 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白差异表达的蛋白质点通过软件分析后, 我们将全部蛋白点 (包括差异蛋白点) 挖出, 通过胶内原位酶解, 然后进行 MALDI-TOF-MS 分析, 并以酶自动降解峰(m/z=1993.9772Da) 进行校正。利用 Expsy 中的 Peptident 查询软件搜索 SWISS-PROT 以及 NCBI

数据库，数据搜索时结合匹配的肽的理论质量数、实验质量数和误差，并结合双向凝胶电泳相应蛋白质点的表观等电点、分子量、匹配片段的多少(5个或以上的肽肽片段匹配)以及氨基酸序列的覆盖率(>30%)进行蛋白质鉴定，在获得的肽质量指纹图谱数据中经数据库检索，目前已得 18 个差异蛋白。图 4-10 为 MALDI-TOF-MS 检索结果中其中的两个差异蛋白，在 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱中查找这 18 个蛋白的相关信息（没有相关信息的按 3.6 节中方法进行序列分析），见表 4-3。

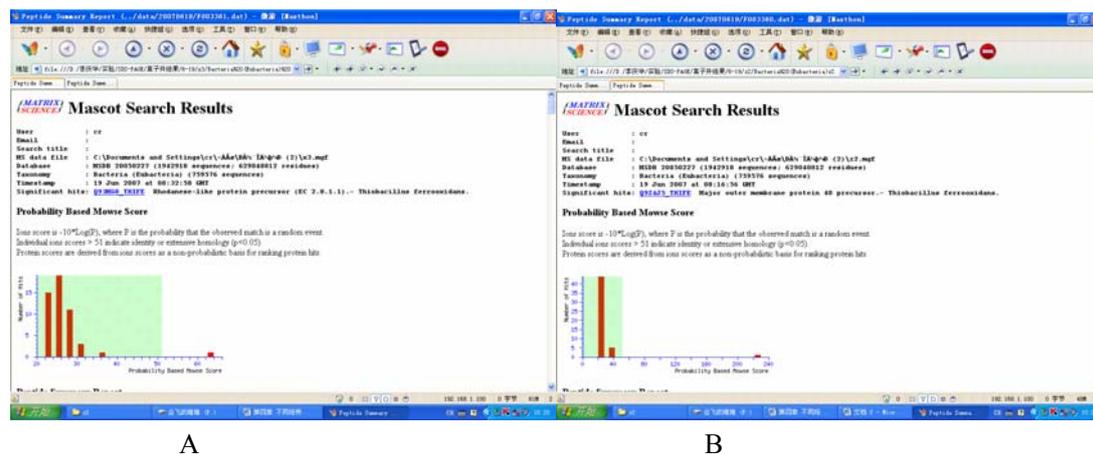


图 4-10 NCBI 上检索到的两个差异蛋白

Figure 4-10. The two different proteins searched in NCBI

- A. [Q93MG8\\_THIFE](#) Rhodanese-like protein precursor (EC 2.8.1.1)- Thiobacillus ferrooxidans;
- B. [Q9Z4J5\\_THIFE](#) Major outer membrane protein 40 precursor.- Thiobacillus ferrooxidans.

表 4-3 已鉴定的 18 个差异蛋白

Table 4-2. Eighteen different proteins identified by MALDI-TOF-MS

| AFE  | Function                                     | Functional category                      | Export signal | Subcellular location       | PI/Mw (Da)      | Score | Match queries |
|------|--|--|---------------|----------------------------|-----------------|-------|---------------|
| 0297 | lipoprotein, putative                        | Cell envelope                            | Sec/Lip       | Periplasmic/ Extracellular | 9.42 / 10253.65 | 151   | 3             |
| 2981 | periplasmic solute-binding protein, putative | Transport and binding proteins conserved | Sec           | Periplasmic                | 9.10 / 36673.42 | 84    | 5             |
| 2954 | conserved hypothetical protein               | conserved hypothetical protein           | Sec           | OuterMembrane /Periplasmic | 8.91 / 28707.44 | 163   | 6             |

表 4-2 续

Table 4-2 continued

| AFE  | Function   | Functional category            | Export signal | Subcellular location                   | PI/Mw (Da)      | Score | Matches |
|------|--|--------------------------------|---------------|--|-----------------|-------|---------|
| 1586 | ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative         | Transport and binding proteins | Sec           | Periplasmic                            | 9.31 / 33547.95 | 87    | 5       |
| 0008 | cytochrome c4  | Energy metabolism              | N-Sec         | Periplasmic                            | 9.49 / 24737.35 | 48    | 1       |
| 3186 | rusticyanin  | Energy metabolism              | N-Sec         | Periplasmic                            |                 | 353   | 31      |
| 0555 | glycine cleavage system H protein, putative                              | Energy metabolism              | N-Sec         | Periplasmic                            | 4.74 / 15033.93 | 208   | 6       |
| 3006 | LysM domain protein  | Unknown function               | Sec           | Extracellular                          | 9.62 / 37600.39 | 23    | 3       |
| 0365 | major outer membrane protein 40  | Transport and binding proteins | Sec           | Extracellular                          | 4.93 / 42251.43 | 192   | 28      |
| 2957 | tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (tolB)                 | Transport and binding proteins | Sec           | Extracellular/Periplasmic              | 7.85 / 44742.25 | 103   | 4       |
| 2429 | hypothetical protein   | hypothetical protein           | N-Sec         | Periplasmic/Cytoplasmic/Outer Membrane | 9.04 / 46292.36 | 57    | 2       |
| 2722 | OmpA family protein  | Cell envelope                  | Sec           | Periplasmic                            | 9.40 / 22924.46 | 146   | 6       |
| 2516 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type                           | Protein fate                   | Sec           | Periplasmic                            | 9.24 / 28022.49 | 318   | 21      |
| 0411 | conserved hypothetical protein   | conserved hypothetical protein | N-Sec         | Periplasmic/Outer Membrane             | 9.69 / 23207.49 | 58    | 3       |
| 2982 | Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein | Unknown function               | Tat           | Periplasmic                            | 6.55 / 29455.49 | 110   | 6       |

表 4-2 续

Table 4-2 continued

| AFE     | Function   | Functional category                              | Export signal | Subcellular location  | PI/Mw (Da)       | Score | Matches |
|---------|--|--|---------------|-----------------------|------------------|-------|---------|
| 2313    | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase conserved | Fatty acid and phospholipid metabolism conserved | No signal     | Cytoplasmic Membrane* | 11.17 / 33422.04 | 51    | 4       |
| 2344    | hypothetical protein                                     | hypothetical protein                             | N-Sec         | Periplasmic           | 6.93 / 20595.58  | 49    | 5       |
| Q93M G8 | Rhodanese-like protein precursor                         |  | Sec           | Periplasmic           | 9.36 / 23780.26  | 63    | 3       |

表中 Sec, SignalP 预测的分泌信号肽, Tat, TatP 预测的双精氨酸转运信号肽, N-Sec, SecretomeP 预测的非经典分泌信号肽。No signal, 没有输出信号肽。

\*, PSORTb 亚细胞定位预测该蛋白位于质膜上, 但是有 non-Cytoplasmic 信号, 故认为该蛋白为跨膜的质膜蛋白, 有一部份结构位于周质空间。

Sec, SignalP prediction; Tat, TatP prediction; N-Sec, SecretomeP prediction;

\*, The protein was predicted by PSORTb software in Cytoplasmic Membrane with non-Cytoplasmic signal. So it could be considered to have a cytoplasmic membrane location with partial component in periplasmic.

根据 PDQuest 软件分析结果, 蛋白质表达上调、下调分析结果见表 4-4。

表 4-4 S 培养条件下与 Fe<sup>2+</sup>培养条件下蛋白表达差异Table 4-4. Differntially-expression proteins of *A. ferrooxidans* cultured in S compared in Fe<sup>2+</sup>

| Locus    | 功能   | 蛋白表达差异 |
|----------|--|--------|
| AFE_0297 | lipoprotein, putative  | ↑      |
| AFE_2981 | periplasmic solute-binding protein, putative                     | ↑      |
| AFE_2954 | conserved hypothetical protein                                   | ↑      |
| AFE_1586 | ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative | ↑      |
| AFE_0008 | cytochrome c4  | ↑      |
| AFE_0365 | major outer membrane protein 40                                  | ↑      |
| AFE_2957 | tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (tolB)         | ↑      |
| AFE_2429 | hypothetical protein   | ↓      |

表 4-4 续

Table 4-4 continued

| Locus    | 功能   | 蛋白表达差异 |
|----------|--|--------|
| AFE_0555 | glycine cleavage system H protein,<br>putative                                 | ↑      |
| AFE_3186 | rusticyanin  | ↓      |
| AFE_3006 | LysM domain protein  | ↑      |
| AFE_2516 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase,<br>PPIC-type                              | ↑      |
| AFE_2722 | OmpA family protein  | ↑      |
| AFE_2982 | Tat (twin-arginine translocation)<br>pathway signal sequence domain<br>protein | ↑      |
| AFE_0411 | conserved hypothetical protein   | ↑      |
| AFE_2344 | conserved hypothetical protein   | ↓      |
| AFE_2313 | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate<br>acyltransferase                              | ↑      |
| Q93MG8   | Rhodanese-like protein precursor   | ↑      |

↓, 表示蛋白在 S 培养时表达量下调, 即在 S 培养条件下表达量比在 Fe<sup>2+</sup>培养时表达量要少。  
↑, 表示蛋白在 S 培养时表达量上调, 即在 S 培养条件下表达量比在 Fe<sup>2+</sup>培养时表达量要多。

↓, Proteins of *A. ferrooxidans* cultured in S were expressed less than that cultured in Fe<sup>2+</sup>.

↑, Proteins of *A. ferrooxidans* cultured in S were expressed more than that cultured in Fe<sup>2+</sup>.

18 个差异蛋白中有 4 个表达下调, 14 个表达上调。其中 Rhodanese-like protein 是 *A. ferrooxidans* 在硫、硫代硫酸盐、黄铁矿及其他硫化物的诱导下表达的, 而在 Fe<sup>2+</sup>存在的培养液中 Rhodanese-like protein 表达受抑制。其分子量为 21kDa, PI=9.18, 与 *Deinococcus radiodurans* 的硫氰酸酶有 27%的同源性, 42%的相似性。与细胞内硫氰酸酶不同, 它位于 *A. ferrooxidans* 细胞外周, 据报道与无机硫代谢有关。而 Ramirez 等人<sup>[94,95]</sup>也有报道说, periplasmic solute-binding protein(AFE\_2981)与 MolA 相关, 其在 S 培养条件下的表达量要高于 Fe<sup>2+</sup>。

## 4.9 讨论

双向电泳步骤繁多, 耗时长, 实验中的各环节对实验结果都有很大的影响。样品制备是蛋白质组研究过程中首要步骤, 也是关系到 2-DE 技术成败的关键。

从组织或细胞样品中提取蛋白质的影响因素很多, 整个提取过程应尽可能多地使组织或细胞样品中的蛋白质溶解于裂解液中, 尤其是低丰度蛋白, 应尽量减少提取过程中蛋白质的降解和丢失。本实验有针对性改进了样品提取方法, 在蛋白提取液中加入尿素等蛋白变性剂消除蛋白质高级结构的影响, 提高了疏水蛋白溶解度, 防止了蛋白丢失。

上样量的选择对于是否能得到高质量的2-DE图谱很重要, 本实验中进行了多次上样量的摸索, 上样量为500 ug时, 大多数蛋白点不能在考染胶上显现出来多少, 必须用银染才能分辨出多少蛋白点; 上样量为800 ug时, 蛋白质就会在考染胶上全部清晰的分离出来, 但是有些点太小不便于MALDI-TOF-MS分析, 所以在实际实验中我们采取了1000 ug的上样量, 用于蛋白分析鉴定。

此外, 等电聚焦不充分或过度等电聚焦会造成在2-DE图谱中斑点在水平方向有拖迹条纹过度等电聚焦还会造成电渗和蛋白质飘移, 因此应该准确把握等电聚焦的时间和电压, 本实验中所采用的等电聚焦程序得到的2-DE图谱未出现水平拖尾。

在第二向SDS-PAGE过程中, 如果凝胶浓度不合适, 或者电泳时电流过大, 电泳过程太快, 会造成部分斑点在局部区域团聚。本实验采用12.5%的分离胶, 并且维持单片凝胶电泳时电流先为20 mA, 30 min, 再采用25 mA, 7 h, 得到了很好的2-DE结果。此外为了提高重复性本实验在第二向SDS-PAGE电泳中去除了浓缩胶。

#### 4.10 本章小结

作为一种主要的矿物浸出细菌, *A. ferrooxidans* 在浸出矿物的过程中会遇到各种不同的矿物界面, 不同的生理环境, 这些因素都会影响到微生物的生理活性, 影响到微生物蛋白质的表达。本实验以  $\text{FeSO}_4$  和单质 S 为能源作为对照组, 每组做了多个重复, 提取的细胞壁相关蛋白通过双向电泳技术分离, 经 PDQuest 软件分析后, 比较了重复组内一致性及对照组的差异。两个培养条件下重复组内 3 块胶的匹配率均达到 90% 以上, 本实验有较好的重复性。同样, 分析得出 S 培养条件下与  $\text{Fe}^{2+}$  培养条件相比细胞壁相关蛋白表达差异点有 93 个。将差异点挖出后, 经 MALDI-TOF-MS 分析, 目前已鉴定出 18 个差异蛋白, 4 个为表达下调, 14 个表达上调。其中 Major outer membrane protein 40 (Omp-40) precursor 和 Rhodanese-like protein precursor 2 个蛋白 Guiliani, N<sup>[45]</sup> 和 Ramirez, P<sup>[46]</sup> 分别对这两个蛋白进行过研究报道。

## 第五章 研究结论与展望

### 5.1 研究结论

本文目的是将提取的 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白质通过 SDS-PAGE 和双向电泳分离后, 分别利用 LC-MS/MS 和 MALDI-TOF-MS 技术对全部 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白及不同培养条件下的差异蛋白进行分析鉴定, 构建其表达图谱和差异图谱。而在实际工作中, 两种技术是交叉使用的, 即实验中 2-DE 图谱上的所有蛋白点都做了 MALDI-TOF-MS 分析鉴定, 补充了 LC-MS/MS 不能分离的蛋白点。而 LC-MS/MS 对蛋白的鉴定也弥补了在双向电泳中不能分离的蛋白的鉴定。同样, 我们也将 SDS-PAGE 图谱上的差异条带进行了 LC-MS/MS, 以方便快捷的对差异蛋白进行分析鉴定。实验中我们利用生物信息学技术构建了 *A. ferrooxidans* PMF 数据库, 解决了 NCBI 等数据库中 *A. ferrooxidans* PMF 不健全的问题, 大大方便了对 *A. ferrooxidans* 蛋白质的鉴定, 也为以后关于 *A. ferrooxidans* 蛋白质的研究奠定了良好的基础。

鉴于 2008 年雪灾造成的机器故障, 目前仅检索到 112 个蛋白。对这 112 个蛋白进行生物信息学分析得知, 97 个蛋白为目标蛋白, 其中 42.3% 有 Sec-type 信号肽, 7.2% 具有双精氨酸转运信号肽, 18.6% 的蛋白具有脂蛋白信号肽, 21.6% 的蛋白为非经典分泌蛋白, 它们通过非常规分泌途径分泌到细胞外。亚细胞定位预测得知, 这些蛋白主要位于周质空间 (Periplasmic)、外膜 (Outer Membrane)、胞外 (Extracellular) 或多位点, 按功能分类 43.3% 的蛋白质为细胞包被蛋白, 16.5% 的蛋白为假设蛋白, 10.3% 的蛋白为转运与结合蛋白, 6.2% 的蛋白为保守的假设蛋白, 还有 6.2% 蛋白为功能未知蛋白, 其他功能的蛋白含量都很少。这些蛋白质的 pH 主要分布在 4~12 之间, 31.96% 的蛋白质的 pH 小于 7, 68.04% 的蛋白质 pH 大于 7, 10.31% 的蛋白 pH 大于 10, 偏碱性蛋白多些, 这可能与 *A. ferrooxidans* 适应酸性环境有关而分子量主要分布在 4000~118000 Da。

基于 2-DE 技术的不同培养条件下 *A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白差异表达, 目前已鉴定出 18 个差异蛋白, 14 个为表达上调, 4 个为表达下调。

### 5.2 展望

*A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱展示了 *A. ferrooxidans* 表面的所有蛋白质, 这为以后的浸矿细菌与矿物表面的界面作用研究提供了一定的依据, 同

时也为后面的研究工作奠定了基础（也就不用反复用质谱来鉴定蛋白质）。在实际浸矿过程中，微生物面临着各种不同的生理环境，pH、温度的不同以及营养缺失都会造成浸矿微生物蛋白质表达的改变。*A. ferrooxidans* 细胞壁相关蛋白表达图谱的构建，将为我们对不同生理环中下 *A. ferrooxidans* 蛋白表达的研究奠定了基础，方便了我们吸附差异的研究，也为我们以后浸矿微生物的选育及浸矿生物反应器的设计指明了方向。

蛋白质组学为微生物研究开辟了一个崭新的领域，经典的蛋白质组研究已经广泛应用于微生物毒力因子、致病性和微生物遗传学研究，并取得了重要进展。随着技术的不断革新，新的研究方法如毛细管等电聚焦—质谱分析方法、蛋白质芯片技术、定量蛋白质组学不断出现，极大地促进了微生物蛋白质组的研究。微生物的研究领域也逐步扩大，如蛋白质组学方法检测和鉴定翻译后修饰。

我们有理由相信，蛋白质组研究与基因组研究互相补充，更完整地解释微生物与矿物吸附及其作用机制，为微生物冶金研究开辟新的天地。

## 参考文献

- [1] Murr L E. Theory and practice of Copper Sulfide Leaching in Dumps and In Situ. Mine Sci.[J], 1980, 12(3): 121-189.
- [2] 阮仁满, 温健康, 车小奎. 紫金山铜矿细菌浸出研究. 有色金属[J], 2000, 52(4): 159-161.
- [3] Olson GJ , Brierley J.A , Brierley C L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. Applied Microbiology Biotechnology[J], 2003, 63: 249-257.
- [4] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler, *et al.* Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Applied Microbiology Biotechnology[J], 2003, 63: 239-248.
- [5] Torma A E. The Role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. In: Ghose TK, Fiechter A, Blakebrough N, editors. Advances in Biochemical Engineering. Berlin: Springer-Verlag; 1977, 1-37.
- [6] Morin D., Lips A., Pinches A., *et al.* BioMinE Integrated Project For The Development Of Biotechnology For Metal-Bearing Materials In Europe. In: Harrison ST, Rawlings DE, Petersen J, editors. Proceedings of 16<sup>th</sup> IBS; 2005.
- [7] Yang S, Xie J, Qiu G, *et al.* Research and application of bioleaching and biooxidation technologies in China. Minerals Engineering [M], 2002, 15: 361-363.
- [8] Ruan R, Wen J. Bacterial Heap-Leaching: Practice In Copper Mine. In: Harrison ST, Rawlings DE, Petersen J, editors. Proceedings of 16<sup>th</sup> IBS, 2005, 137-144.
- [9] Colmer AR, Hinckle M E. The role of microorganisms in acid mine drainage. A Preliminary Report, Science, 1947, 106: 253-256.
- [10] K.L.Temple and E.W. Delchamps. Autotrophic bacteria and the formation of acid in Bituminous Coal Mines. Applied Microbiology[J], 1953, 1: 255-258.
- [11] W.W.Leathen, N.A.Kinsel, S.A.Braley. *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. Bacterial[J], 1956, 72: 700-704.
- [12] L.C.Bryner, *et al.* Microorganisms in leaching of sulfide minerals. Industrial and Engineering Chemistry[J], 1954, 46: 2587-2592.
- [13] M.L.Sampson. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. Minerals engineering, 2000, 13(4): 373-389.

- [14] G.J.Olson, J.A.Brierley, C.L.Brierley. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology Biotechnology*[J], 2003, 63: 249-257.
- [15] R.C.Blake II, E.A.Shute, G.T.Howard. Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite and sulfur. *Applied and environmental microbiology*[J], 1994, 60(9): 3349-3357.
- [16] P.Devasi, K.A.Natarajan, D.N.Sathyanarayana, *et al.* Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Applied and environmental microbiology*[J], 1993, 59(12): 4051-4055.
- [17] N.Ohmura, K.Tsugita, J.Koizumi, *et al.* Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of bacteriology*[J], 1996, 178(19): 5776-5780.
- [18] M.I.Sampson. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. *Minerals engineering*[J], 2000, 13(4): 373-389.
- [19] R.Arredondo, A.Garcia, C.A.Jerez. Partial removal of polysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol*[J], 1994, 60: 2848-2851.
- [20] T.Gehrke, R.Hallman, W.Sand. In: C.A.Vargas, Jerez J.V.Wiertz and eds. *Biohydrometallurgical Processing, Vol.1.* Santiago Chile: University of Chile, 1995.1.
- [21] W.Sand, T.Gehrke, P.G.Jozsa, A.Schipper. Direct versus indirect bioleaching. In: R.Amils, A.Ballester eds. *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21<sup>st</sup> Century, Part A.* Amsterdam. Lausanne. New York. Oxford. Shannon. Singapore. Tokyo: Elsevier, 1999.27.
- [22] 傅建华. 硫化铜矿浸矿细菌超微结构与吸附机理及 SFORase 的纯化: [博士学位论文]. 长沙: 中南大学, 2004.4.
- [23] 谢念铭. 医学细菌电镜图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994.8.
- [24] Van Loosdrecht, M.C.M., J.Lyklema, W.Norde, A.J.B.Zehnder. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol*[J], 1990, 54:75-87.
- [25] Douglas E Rawlings. *Biomining Theory, Microbes and Industrial Processes.* Springer Verlag and Landes Bioscience[J], 1997: 35~42
- [26] 李蕾, 应万涛, 杨何义. 蛋白质组研究中的二维电泳分离技术. *色谱*[J], 2003, 21(1): 27-31.
- [27] 刘上峰, 傅俊江, 李麓芸. 双向电泳技术原理及其应用. *国外医学·生理、病*

- 理科学与临床分册[M], 2002, 22(2): 197-199.
- [28] 李义良, 朱华清, 张红锋. 双向电泳技术-生物学教学[M], 2004, 29(4): 64.
- [29] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 科学出版社, 1997.
- [30] Chalmers M J, Gaskell S J. Advances in mass spectrometry for proteome analysis. *Curr Opin Biotechnol*[J]. 2000, 11(4): 384-390.
- [31] Jan H S, Cordwell S J, Blackstock W P. Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis*[J], 1997, 18(8): 1217-1242.
- [32] Aeljung P, Shenw, RozalskaB, HellmanU, Ljungh A, Wadsom T. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol*[J], 1994, 28: 231-236.
- [33] Rojas M, Ascencio F, Conway P. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol*[J], 2002, 68: 2330-2336.
- [34] Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*[J], 1970, 227:680-685.
- [35] Bjellqvist B., Sanchez J.C., Pasquali C., *et al*, Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*[J], 1993, 14: 1357-1365.
- [36] Schupbach J, Ammann R.W, Freiburghaus A.U. A universal method for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins using isoelectric focusing on immobilized pH gradients in the first dimension. *Anal Biochem*[J], 1991, 196(2): 337-343.
- [37] Giovanni, C., Maurizio, B., Luca, M., *et al.*, Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*[J], 2004, 25: 1327-1333.
- [38] Mawuenyega K.G, Kaji H, Yamuchi Y, Shinkawa T, Saito H, Taoka M, Takahashi N , Isobe T. Large-scale identification of *Caenorhabditis elegans* proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*[J], 2003, 2: 23-35.
- [39] Veronique Santoni, Mark Molloy, Thierry Rabilloud. Membrane proteins and proteomics: Unamour impossible? *Electrophoresis*[J], 2000, 21: 1054-1070.
- [40] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*[J], 2000, 405: 837-846.

- [41] Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis*[J], 1999, 20(3): 664-667.
- [42] O'Donovan C, Apweiler R, Bairoch A. The human proteomics initiative(HPI). *Trends Biotech*[J], 2001, 19: 178-181.
- [43] Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis*[J], 1999, 20(3): 664-667.
- [44] Van loosdrecht M.C.M, Zehnder A.J.B.. Energetics of bacterial adhesion. 1990; B. Energetics of bacterial[M], 1990: 817-822.
- [45] Guiliani N, Carlos A., Jerez. Molecular Cloning, Sequencing and Expression of omp-40, the Gene Coding for the Major Outer Membrane Protein from the Acidophilic Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*[J], 2000, 6(66): 2318-2324.
- [46] Pablo Ramí' rez, Héctor Toledo, Nicolas Guiliani, Carlos A. Jerez1. An Exported Rhodanese-Like Protein Is Induced during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in Metal Sulfides and Different Sulfur Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*[J], 2002(4): 1837-1845.
- [47] Renato Arredondo, Alberto Garcia, Carlos A., *et al.* Removal of Lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* Affects Its Adhesion to Solids. *Applied and Environmental Microbiology*[J], 1994: 2846-2851.
- [48] Kohr, William J., Shrader, *et al.* Heap bioleaching of copper from chalcopyritic ore concentrates using thermophilic bacteria for increased process temperature (P), WO 2000036168 2000, 6, 70.
- [49] Ray Bakhtiar, Randall W., Nelson. Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Biochemical Pharmacology*[J], 2000, 59: 891-905.
- [50] 赵晓光, 薛燕, 刘炳玉. MALDI-TOF质谱仪关键技术及进展. *仪器评价*[M], 2003, 4: 17-20.
- [51] Kris Gevaert, Joel Vandekerckhove, Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*[J], 2000, 21: 1145-1154.
- [52] 刘晗青, 郭寅龙. 傅立叶变换-离子回旋共振质谱法在蛋白质分析中的应用. *质谱学报*[J], 2003, 24(2): 363-369.
- [53] J.S.Page, C.D.Masselon, R.D.Smith. FTICR mass spectrometry for qualitative and quantitative bioanalyses. *Current opinion in Biotechnology*[M], 2004, 15: 3-11.

- [54] Kris Gevaert, Joël Vandekerckhove. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*[J], 2000, 21: 1145-1154.
- [55] A.Sickmann, M.Mreyen, H.E.Meyer. Identification of modified Proteins by Mass Spectrometry. *IUBMB Life*[M], 2002, 54: 51-57.
- [56] G.J Opiteck, James W.Jorgenson. Two-dimensional SEC/RPLC Coupled to Mass spectrometry for the Analysis of peptides. *Anal Chem*[J], 1997, 69: 2283-2291.
- [57] Gregory J. Opiteck. *Comprehensive Two-Dimensional High-performance Liquid Chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping*. *Analytical Biochemistry*[M], 1998, 258: 349-361.
- [58] K.wagner, K.K.Unger. Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*[J], 2000, 893(2): 293-305.
- [59] K.wagner Tasso Miliotis, Gyorgy Marko varga. Rainer Bischoff and K.K. Unger: An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Anal Chem*[J], 2002, 74: 809-820.
- [60] Hongji Liu, Scott J.B, A.B Chakrabarty, R.S Pumb Steven A.Cohen. Multidimensional chromatography coupled to electrospray ionization time of flight mass spectrometry as an alternative to two dimensional gels for the identification and analysis of complex mixtures of intact proteins. *Journal of Chromatography B*[J], 2000, 782: 267-289.
- [61] Garry L.Corthals, Valerie C.Wasinger, Denis F.Hochstrasser, Jean-Charles Sanchez. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis*[J], 2000, 21: 1104-1112.
- [62] Richard J, Simpson. 蛋白质与蛋白质组学实验指南[M], 化学工业出版社, 2006.
- [63] 贺治国. 氧化亚铁硫杆菌遗传多样性及比较蛋白质组学研究. [博士学位论文]. 长沙: 中南大学. 2005.6.
- [64] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M], 北京:科学出版社, 2001, 1-19.
- [65] 李秀艳, 魏德洲, 郑龙熙. 含砷金精矿生物预氧化过程中细菌吸附的作用. *东北大学学报(自然科学版)*, 2000, 21(6): 641-643.
- [66] Murthy K., S.N.Natarajan K.A. The Role of Surface Attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on the Biooxidation of Pyrite. *Minerals and Metallurgical Processing*[J], 1992, 2: 24-29.
- [67] Ohmura N., Tsugita K., Koizumi J, Saiki H. Sulfur-Binding Protein of Flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*[J], 1996, 178(19):

- 5776-5780.
- [68] Ohmura, N. Blake II, R.C. Aporusticyanin Mediates the Adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to Pyrite. In International Biohydrometallurgy Symposium IBS97, Biomine 97, Sydney, Australia, 1997, PB1. 1-PB1. 9.
- [69] Sampson, M.I., Blake II R.C. Cell Attachment and Oxygen Consumption of Two Strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering[J], 1999, 12 (6): 671-686.
- [70] Sampson, M. I. Phillips, C. V., Blake II R. C. Influence of the Attachment of Acidophilic Bacteria during the Oxidation of Mineral Sulfides. Mineral Engineering[J], 2000, 13(4): 373-389.
- [71] Maria Teresa M. Novo<sup>1</sup>, Alba C. da Silva, Ronaldo Moreto. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. Antonie van Leeuwenhoek[J], 2000, 77: 187-195.
- [72] Andre's Yarza'bal, Gae'l Brasseur, Jeanine Ratouchniak. The High-Molecular-Weight Cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Is an Outer Membrane Protein. Journal of bacteriology[J], 2002, 1: 313-317.
- [73] Bendtsen J.D., Kiemer L., Fausboll A., Brunak S. Nonclassical protein secretion in bacteria. BMC Microbiol[M], 2005, 5: 58.
- [74] An Chi, Lissette Valenzuela, Simon Beard. Periplasmic Proteins of the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Molecular & Cellular Proteomics[J], 2007, 6(12): 2239-2251.
- [75] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 67-69.
- [76] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol, 2004, 340(4): 783-795.
- [77] Bendtsen J D, Nielsen H, Widdick D., *et al.* Prediction of twin-arginine signal peptides. BMC Bioinformatics[J], 2005, 6(167): 1-9.
- [78] Juncker A S, Willenbrock H, von Heijne G, *et al.* Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. Protein Science, 2003, 12(8): 1652.
- [79] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol[J], 2001, 305(3): 567-580.
- [80] Zhou H, Zhou Y. Predicting the topology of transmembrane helical proteins

- using mean burial propensity and a hidden-Markov model-based method. *Protein Sci*[J], 2003, 12: 1547-1555.
- [81] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, 300: 1005-1016.
- [82] Bendtsen J D, Kiemer L, Fausboll A, *et al.* Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol*[J], 2005, 5: 58.
- [83] Lee S A, Wormsley S, Kamoun S, *et al.* An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast*, 2003, 20(7): 595-610.
- [84] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* [J], 2004, 340(4): 783-795.
- [85] Z.Lu, D.Szafron, R.Greiner, *et al.* Predicting Subcellular Localization of Proteins using Machine-Learned Classifiers. *Bioinformatics*[J], 2004, 20(4): 547-556.
- [86] Yu C S, Lin C J, Hwang J K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science*[J], 2004, 13: 1402-1406.
- [87] Yu C.S, Chen Y.C, Lu C.H, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2006.
- [88] J.L.Gardy1, M.R.Laird1, F.Chen S. PSORTb v.2.0: Expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics*[J], 2005, 5(21): 617-623.
- [89] Eisenhaber B., Bork P., Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Engineering*[J], 1998, 11(12): 1155-1161.
- [90] Sunyaev S.R., Eisenhaber F., Rodchenkov I.V., *et al.* PSIC: Profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Engineering*[J], 1999, 12(5): 387-394.
- [91] Eisenhaber B., Bork P., Eisenhaber F. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *JMB*[J], 1999, 292(3): 741-758.
- [92] Eisenhaber B., Bork P., Yuan Y., Loeffler G., Eisenhaber F. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C.elegans*. *TIBS*[J], 2000, 25(7): 340-341.
- [93] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.

- Microbiol[J], 2003, 67: 593-656.
- [94] Ramirez P., Guiliani N., Valenzuela L., Beard S., Jerez, C.A. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulfides. Appl. Environ. Microbiol[J], 2004, 70: 4491-4498.
- [95] Valenzuela, L., Beard, S., Guiliani, N., Jerez C.A. Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, Cape Town, South Africa, September 25-29<sup>th</sup>, 2005.
- [96] Harrison, S. T. L., Rawlings, D. E., Petersen, J., eds. pp. 773-780, 16<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, Compress.

## 致 谢

时光如白驹之过隙，挥袖间七年的长沙求学生涯即将结束。回首与老师同学相处的日子，真觉得这这段生活是我生命里最有意义最重要的三年的时间。它让我感觉到了集体的温馨，科研的艰辛以及收获的喜悦。

本论文是在胡岳华教授、贺治国副教授的悉心指导下完成的。导师们严谨治学、诲人不倦的作风、高屋建瓴的风范和矢志不移的科学奉献精神使我在做人和治学方面受益匪浅。导师们对我学业上的精心指导和生活上的亲切关怀令我终身不忘，在此表示崇高的敬意和衷心的感谢！

在研究过程中，还得到了徐竞老师、陈玉如老师、柳建设老师、刘新星老师、刘学端老师、夏金兰老师、周洪波老师、杨宇老师、吴学玲老师、程海娜老师、夏乐先老师、朱建裕老师的热心帮助和支持。在此同样表示衷心的感谢和敬意！

感谢湖南师范大学曹锐老师及湘雅医学院杨静老师为我的实验提供了仪器和热心的指导，感谢吕荣同学的帮助。

在实验过程中，还得到了实验室丁建南博士、张成桂博士、尹华群博士、何环博士及戴志敏博士的指导和帮助，对我的实验提出了许多好的建议，表示衷心的感谢！

在论文的进行中，还得到了肖升木师兄、谢学辉师姐和刘飞飞、霍强师兄以及同届研究生高凤玲、管昊、胡培磊、肖水明、欧阳叙东、孟浩、王秀美等同学的无私帮助和支持。在此，对他们一并表达我真挚的感谢！

还要衷心感谢邢庆华、朱宁、赵健存等师弟师妹们的帮助和支持。

最后要感谢我的家人，他们是我奋斗不竭的能量源泉，感谢他们在学习和生活上对我的关心和支持。父母养育之恩，无以回报，你们永远健康快乐是我最大的心愿。

衷心感谢在百忙之中抽出时间审阅本论文的专家教授，感谢答辩委员会的各位老师和专家们对我的论文提出的宝贵建议，为我今后的学习和研究开拓了思路。

李庆华  
2008.5

## 研究成果

### 发表论文情况

- 1、 Zhiguo He\*, Hui Zhong\*, Qinghua Li\*, Yuehua Hu. Ressearch on the Proteome Response of *A.ferrooxidans* to Phosphate Starvation by SELDI ProteinChip Technology.
- 2、 Zhiguo He, Shengmu Xiao, Xuehui Xie, Hui Zhong, Yuehua Hu, Qinghua Li, Fengling Gao 等, Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine.
- 3、 Zhiguo He, Shengmu Xiao, Xuehui Xie, Yuehua Hu, Hui Zhong, Fenglin Gao, Qinghua Li, Jianshe Liu. Compositions and Structures of Archaeal communities in Acid Mineral Bioleaching Systems of Dongxiang Copper Mine and Yinshan Lead-Zinc Mine.

### 获奖情况

2007.6 被中南大学评为“优秀共产党员”