



## 应用iTRAQ定量蛋白质组学研究海分枝杆菌*mkl*的基因功能

施旭骏, 赵超, 牛辰, 高谦\*

复旦大学基础医学院, 教育部/卫生部医学分子病毒学重点实验室, 上海 200032

**摘要:** 【目的】通过分离海分枝杆菌野生株和*mkl*突变株的全菌蛋白, 并进行差异蛋白质组分析, 以期探索分枝杆菌重要毒力基因*mkl*的功能提供新思路。【方法】以海分枝杆菌野生株和*mkl*突变株为研究材料, 提取全菌蛋白, iTRAQ试剂标记后进行质谱鉴定和定量分析, 并利用UniProt数据库对差异蛋白进行生物信息学分析。【结果】共鉴定出在野生株和*mkl*突变株中差异表达蛋白566个, 其中在突变株中上调表达蛋白232个(比值 $\geq 1.4$ ), 下调表达蛋白334个(比值 $\leq 0.7$ )。生物信息学预测这些蛋白主要参与细菌脂质代谢、细胞壁和细胞进程、中间代谢、呼吸作用等生物学功能。其中DesA3下调最显著, 其功能为脂肪酸去饱和酶, 与油酸合成相关, 进一步验证发现*mkl*突变株在不含油酸的固体培养基中生长受限, 提示*mkl*可能在油酸的生物合成通路中发挥功能。【结论】通过iTRAQ分析了海分枝杆菌*mkl*突变株和野生株的差异表达蛋白谱, 发现可能影响分枝杆菌油酸、脂质等合成代谢通路, 为进一步研究*mkl*基因在分枝杆菌致病中发挥作用的相关机制奠定了基础。

**关键词:** 分枝杆菌, 定量蛋白质组学, iTRAQ, *mkl*基因

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的结核病仍是全球主要健康问题之一。由于结核分枝杆菌的强致病性和传染性, 对其研究需要在生物安全三级实验室中进行, 且其生长缓慢进一步限制了研究进展, 近年来将海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)作为结核分枝杆菌的模式菌来研究其致病机制逐渐得到了较为广泛的应用<sup>[1]</sup>。

结核分枝杆菌*mkl*基因(*Rv0655*), 对应海分枝

杆菌中的*MMAR\_0994*, 被注释编码ATP结合盒式转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC转运体)中的ATP结合蛋白。ABC转运体是一类广泛存在于原核和真核生物中的蛋白超家族, 通过结合、水解ATP提供能量, 参与各种物质(如离子、氨基酸、多肽、抗生素、蛋白等)的跨膜转运<sup>[2-3]</sup>。它通常由2个跨膜结构域(membrane spanning domain, MSD)和2个核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD)组成, 若是输入系统, 则还

基金项目: 国家自然科学基金(81271790, 81201256)

\*通信作者。Tel: +86-21-54237195; E-mail: qiangao@fudan.edu.cn

收稿日期: 2015-12-14; 修回日期: 2016-01-17; 网络出版日期: 2016-03-11

有胞外高亲和力的底物结合蛋白(substrate binding protein, SBP)。NBD能结合ATP, 将水解ATP产生的能量用于物质运输, NBD的氨基酸序列高度保守, 含有WalkerA、WalkerB模体。MSD由4–8个 $\alpha$ 螺旋形成跨膜通道, 序列缺乏保守型, 但含有EAA环等特征序列<sup>[4]</sup>。许多细菌的ABC转运体中, 编码这些结构域的基因通常在同一操作子或者基因区域中。随着结核分枝杆菌全基因组序列的完成, 通过特征性序列比对分析, 发现结核分枝杆菌共编码38个NBD蛋白, 44个MSD蛋白和15个SBP蛋白。通过进一步的转录分析和同源性分析, 将这些蛋白重组归类为26个完整的和11个不完整的ABC转运体<sup>[3]</sup>。

通过对*mkl*基因的序列分析, 确认其含有WalkerA和WalkerB等特征序列, 但是并未找到跨膜螺旋序列, 其基因位置也不在其他转运系统元件的附近, 属于不完整的ABC转运体<sup>[3]</sup>。由*mce*操纵子编码的Mce家族蛋白也是一类ABC转运体, 有研究通过在*mce1*或*mce4*敲除的结核分枝杆菌上进一步构建转座子插入突变库, 筛选发现Mkl可能与*mce1*或*mce4*操纵子中跨膜蛋白YrbEAB相互作用, 共同组成ABC转运系统, 为Mce转运体操纵子提供能量, 且与细菌毒力相关<sup>[5]</sup>。进一步研究发现, Mkl参与Mce4操纵子转运胆固醇<sup>[6]</sup>, 但Mce1操纵子不参与胆固醇的转运。但是*mkl*基因位置和*mce*操纵子相隔很远, 尚未能验证Mkl与Mce蛋白直接相互作用。这些都提示Mkl作为ATP酶可能还与其他蛋白相互作用, 或为其他转运系统提供能量, 参与调节分枝杆菌的生理功能。本课题组通过筛选海分枝杆菌转座子插入突变库, 得到了*mkl*突变株, 发现*mkl*突变株在斑马鱼成鱼和幼鱼以及巨噬细胞感染模型中, 毒力相对野生株显著减弱, 表明*mkl*基因在细菌抵抗宿主固有免疫和适应性免疫中均有重要功能<sup>[7]</sup>。但目前对于*mkl*基因作用机制的认识很有限。

同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是美国应用生物系统公司在2004年推出的一项同位素标记的蛋白质定量技术<sup>[8–9]</sup>, 可以高通量分析生物样本中的蛋白及其表达情况, 通过比较不同样本之间的差异蛋白, 全面、系统地揭示生理过程的变化。本文采用iTRAQ分析海分枝杆菌*mkl*突变株和野生株的菌体蛋白, 通过对蛋白定量分析, 旨在寻找*mkl*突变株中的差异蛋白, 为阐明分枝杆菌*mkl*基因的功能提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、培养基和培养条件

海分枝杆菌M菌株(ATCC BAA-535)由加拿大多伦多大学刘军教授转赠, *mkl*突变株(MMAR\_0994::Tn)和*mkl*互补株(Tn::pSMT3-MM0994)由本实验室前期构建。海分枝杆菌32 °C避光培养于含0.2%甘油和10% OADC的7H9液体培养基, 或含0.5%甘油和10% OADC的7H10固体培养基中, 必要时添加卡那霉素40  $\mu$ g/mL, 潮霉素B 50  $\mu$ g/mL。

### 1.2 全菌体蛋白提取

收集 $OD_{600}$ 约为1.0的菌液50 mL, 用1 $\times$ PBS (pH 7.4)缓冲液清洗3遍。离心后所得沉淀用5 mL裂解液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF)重悬, 超声裂解(300 V, 25%功率, 20 min, 超声5 s停5 s), 4 °C 15000 $\times$ g离心20 min, 收集上清。用Bradford法蛋白定量, 并用12% SDS-PAGE检测总蛋白提取质量。iTRAQ标记前样本于–80 °C冻存。

### 1.3 iTRAQ标记

按照iTRAQ试剂盒(Applied Biosystem)的说明书操作, 具体如下: 取100  $\mu$ g蛋白样品, 加入还原试剂, 60 °C反应1 h, 加入半胱氨酸封闭试剂,

室温处理10 min, 以丙酮:样品体积比=5:1加入预冷的丙酮,  $-20^{\circ}\text{C}$ 沉淀1 h,  $4^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times$ g离心20 min。取沉淀, 加入溶解液20  $\mu\text{L}$ , 充分溶解样品。按照酶:蛋白质=1:20的比例加入胰蛋白酶(Sigma),  $37^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜。将标记试剂(113、114、115和116)平衡至室温, 每管加入70  $\mu\text{L}$ 乙醇, 混匀后分别加入各管样品中。113和114标记野生株, 115和116标记突变株。室温反应1 h, 之后各加入3倍体积的水, 使标记试剂分解。

#### 1.4 高pH反相色谱分离

将标记好的肽段第一维用高pH反相色谱(岛津20AD)分离。使用210 mm $\times$ 150 mm X Bridge BEH300柱子(Waters), 流速为200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 60 min, 紫外检测波长214/280 nm, A相流动相为20 mmol/L甲酸铵, pH 10, B相流动相为20 mmol/L甲酸铵, 100% ACN, pH 10。B相梯度如下: 5 min至5%, 40 min至25%, 45 min至80%, 50 min 80%, 51 min至0%, 60 min停止。根据峰型和时间共收取20个梯度, 真空离心浓缩后, 用50  $\mu\text{L}$  RPLC A相(5% ACN, 0.1%甲酸)溶解, 进行第二维分析。

#### 1.5 反向液质联用RPLC-MS

样品经ZORBAX 300SB- $\text{C}_{18}$ 柱子(5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 10 mm $\times$ 150 mm)反相分离, 流速300  $\mu\text{L}/\text{min}$ , A相流动相为5% ACN, 0.1%甲酸, B相流动相为95% ACN, 0.1%甲酸。B相梯度为5 min至5%, 70 min至45%, 72 min至80%, 77 min至80%, 80 min至5%, 90 min停止。液相分离后用Triple TOF 5600 (Applied Biosystems)进行质谱鉴定。质谱扫描范围100–2000  $m/z$ , 扫描模式为HS高灵敏度模式, 累积时间0.1 s, IDA采集模式, 从一级质谱中选择20个信号最强的母离子进行串联扫描, 二级质谱扫描范围100–2000  $m/z$ 。

#### 1.6 生物信息学分析

使用ProteinPilot v4.5软件Paragon算法对

Uniprot-Mycobacterium marinum (strain ATCC BAA-535/M)数据库进行搜索。搜库参数: 最大漏切位点数2。数据过滤标准为Peptide FDR $<0.01$ , Peptide score $>10$ 。根据一组肽段同位素报告基团相对含量的比例进行定量, 利用2组iTRAQ定量平均值的比值,  $\geq 1.4$ 或 $\leq 0.7$ 认为有差异。采用以SwissProt海分枝杆菌数据库为基础的功能注释分析差异蛋白细胞组分、分子功能和生物进程。

#### 1.7 细菌增殖检测

取对数期细菌( $OD_{600}$ 约1.0), 离心收集菌液, PBS清洗3遍, 超声分散后重悬, 调整 $OD_{600}$ 至0.1, 然后进行10倍梯度稀释( $10^{-2}$ – $10^{-6}$ ), 每个梯度各取5  $\mu\text{L}$ 滴到7H10-OADC或7H10-ADC平板上, 密封倒置培养7 d后观测菌落生长。

## 2 结果和分析

### 2.1 蛋白质组鉴定和iTRAQ定量分析

我们将抽提的野生株和突变株的总蛋白各采用2种标记物标记(作为重复), 通过质谱分析, 得到4组数据, 共鉴定出3132种蛋白质, 其中3112种蛋白质4个定量信息均完整。取野生株和突变株的变化趋势一致的2个定量值, 分别取平均值, 两者相比得到定量蛋白ratio值(代表Mut/WT), 绝大部分在1.0附近(图1)。参考已有文献报道的通用数值<sup>[10–11]</sup>, 我们选择突变株和野生株表达蛋白量的比值ratio $\geq 1.4$ 或ratio $\leq 0.7$ 的蛋白作为表达差异蛋白, 共发现566个差异蛋白, 其中在突变株中上调表达蛋白232个, 下调表达蛋白334个, 表1和表2分别列出上调和下调排名前10的蛋白及功能注释。其中突变株相对野生株下调比例最显著的是Mkl蛋白, ratio值为0.114, 与预期相符。因为突变株中mkl基因携带插入突变, 导致Mkl蛋白无法正常表达, 这也从侧面印证了iTRAQ实验结果的可靠性。

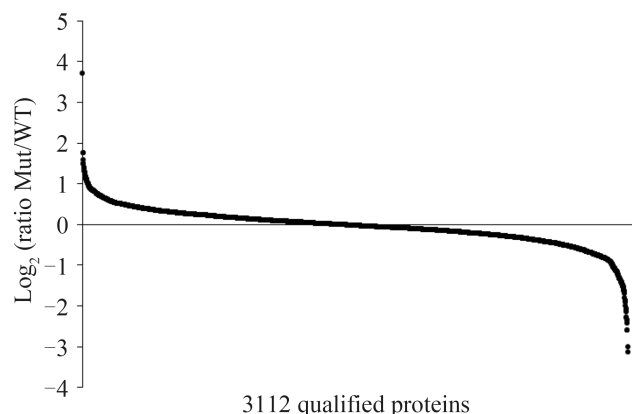


图 1. 突变株与野生株的蛋白比值分布图

Figure 1. The distribution of  $\log_2$  (ratio of Mut/WT). Each dot represents the  $\log_2$  (ratio Mut/WT) of one identified protein. Most dots are distributed within  $|\log_2$  (ratio Mut/WT)| < 0.5, which means the protein expression are not altered; only a small portion of dots are outside this region, which means those proteins are differentially expressed.

## 2.2 差异蛋白功能类别分析

根据SwissProt海分枝杆菌蛋白功能注释, 对566个差异蛋白进行功能分析(下调的蛋白中有6个无功能注释, 未纳入后续分析)。如图2所示, 无论上调或下调, 差异表达的蛋白主要分布在1类(脂质代谢)、3类(细胞壁和细胞进程)、7类(中间代谢和呼吸作用)和10类(保守的假定蛋白)。

## 2.3 突变株在不含油酸的固体培养基中生长受限

分析iTRAQ数据发现, *mkl*突变株中DesA3、DesA3\_2、DesA3\_1蛋白含量相对野生株的下调比例分别位于前2、3和20位, 表达下调比值为0.13、0.17和0.32。编码这3个蛋白的基因分别为*desA3* (MMAR\_1315)、*desA3\_2* (MMAR\_0336)和*desA3\_1* (MMAR\_1316), 其中*desA3*在结核分枝杆菌中对应的基因为*Rv3229c*。基因*desA3*被认为编码脂肪酸去饱和酶, 与油酸的合成密切相关。我们推测突变株中DesA3蛋白表达下调, 可能导致油酸不能正常合成, 进而造成细菌相应的生理变化。

为了验证我们的假设, 我们比较了野生株、突变株及互补株在含有油酸的7H10-OADC和不含油酸的7H10-ADC固体培养基中的生长情况。结果显示, 在7H10-OADC固体培养基中, 3种菌株的生长无明显差异, 稀释至 $OD_{600}=10^{-6}$ 仍可见菌落形成。在不含油酸的7H10-ADC固体培养基中, 野生株生长与丰富培养基中类似, 而*mkl*突变株在稀释至 $10^{-4}$ 时菌落生长就显著受到抑制, 稀释至 $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ 时几乎不生长, 没有菌落形成, *mkl*互补株则能回补生长表型(图3)。以上结果提示*mkl*可能在分枝杆菌的油酸合成通路中发挥作用。

表1. 突变株相较野生株表达上调比例前10的蛋白

Table 1. Top 10 up-regulated proteins in the *mkl* mutant compared to WT strain

MM No.	Rv No.	Gene name	Protein description	Ratio (Mut/WT)
MMAR_4325	—	—	Transcriptional regulatory protein (Probably TetR-family)	13.15
MMAR_3280	—	—	Uncharacterized protein	3.39
MMAR_2110	Rv2593c	<i>ruvA</i>	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA	3.02
MMAR_3867	—	<i>mce5D</i>	MCE-family protein Mce5D	2.86
MMAR_1266	Rv3273	<i>sulP_2</i>	Transmembrane carbonic anhydrase, SulP_2	2.78
MMAR_5440	Rv3865	—	Uncharacterized protein	2.65
MMAR_2949	—	—	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2.65
MMAR_1887	Rv2846c	<i>efpA</i>	Integral membrane efflux protein EfpA	2.59
MMAR_3250	Rv2206	—	Conserved transmembrane protein	2.48
MMAR_3204	Rv2169c	—	Conserved hypothetical membrane protein	2.44



表2. 突变株相较野生株表达下调比例前10的蛋白  
Table 2. Top 10 down-regulated proteins in the *mkl* mutant compared to WT strain

MM No.	Rv No.	Gene name	Protein description	Ratio (Mut/WT)
MMAR_0994	Rv0655	<i>mkl</i>	Ribonucleotide-transport ATP-binding protein ABC transporter, Mkl	0.11
MMAR_1315	Rv3229c	<i>desA3</i>	Linoleoyl-CoA desaturase, DesA3	0.13
MMAR_0336	–	<i>desA3_2</i>	Linoleoyl-CoA desaturase, DesA3_2	0.17
MMAR_0515	Rv0251c	<i>hsp</i>	Heat shock protein Hsp	0.17
MMAR_1928	Rv2780	<i>ald</i>	Alanine dehydrogenase	0.19
MMAR_3140	–	–	Uncharacterized protein	0.20
MMAR_1520	–	–	Uncharacterized protein	0.20
MMAR_2826	Rv1920	–	Conserved hypothetical membrane protein	0.21
MMAR_3484	Rv2031c	<i>hspX_1</i>	Heat shock protein HspX_1	0.21
MMAR_3704	–	<i>desA1_1</i>	Acyl-[acyl-carrier protein] desaturase DesA1_1	0.23

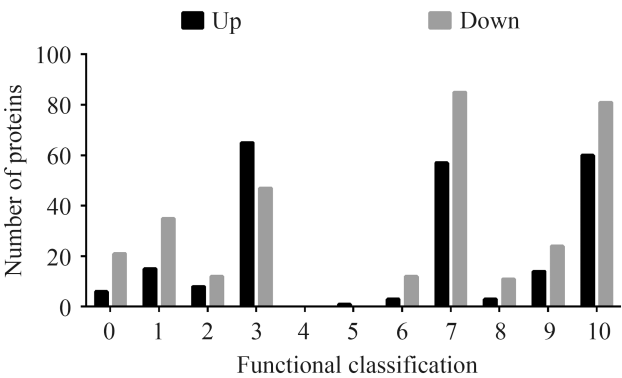


图 2. 野生株和突变株差异表达蛋白的功能分布  
Figure 2. The functional classification of the differentially expressed proteins in the *mkl* mutant compared to WT strain. 0: virulence, detoxification, adaptaion; 1: lipid metablism; 2: information pathways; 3: cell wall and cell processes; 4: stable RNAs; 5: insertion seqs and phages; 6: PE/PPE; 7: intermediary metabolism and respiration; 8: unknown; 9: regulatory roteins; 10: conserved hypotheticals.

3 讨论

本文采用iTRAQ技术对海分枝杆菌*mkl*突变株和野生株进行定量蛋白质组学研究，以突变株比野生株蛋白表达比值 $\geq 1.4$ 和 $\leq 0.7$ 作为分界值，共找到566个差异表达的蛋白，主要为细胞壁相关蛋

白和代谢相关蛋白。同时根据蛋白质组学数据，推测*mkl*突变可能影响突变株对油酸的代谢，并用实验证实*mkl*突变株在不含油酸固体培养基中生长缺陷，提示*mkl*在油酸的合成通路中发挥一定作用。

对于Mkl的具体功能及其与Mce家族蛋白的关系目前仍存在疑问。之前研究推测Mkl与Mce1家族蛋白相互作用。本研究结果中*mceI*操纵子编码的YrbE1B和Mce1A–E 7个蛋白在突变株中均显著下调，其中变化最明显的Mce1A，下降ratio值达到0.45，排在第41位。这提示Mkl可能与Mce1存在功能联系。已有研究证实Mce1A–E作为ABC转运体亚基，存在于分枝杆菌细胞壁中，与细菌脂质运输相关，*mceI*突变株的细胞壁成分中分枝菌酸累积<sup>[12–13]</sup>。而在iTRAQ结果中，还发现PcaA蛋白上升，PcaA是合成分枝菌酸中 $\alpha$ -分枝菌酸的环丙烷结构的关键酶，与细菌的索状结构形成相关<sup>[14]</sup>。以上两者提示*mkl*突变株中分枝菌酸的含量或成分可能存在改变。

突变株中多个DesA系列蛋白含量大幅下降。DesA是脂肪酸去饱和酶，其作用是将长链饱和脂肪酸去饱和形成不饱和脂肪酸。根据不同的脂肪

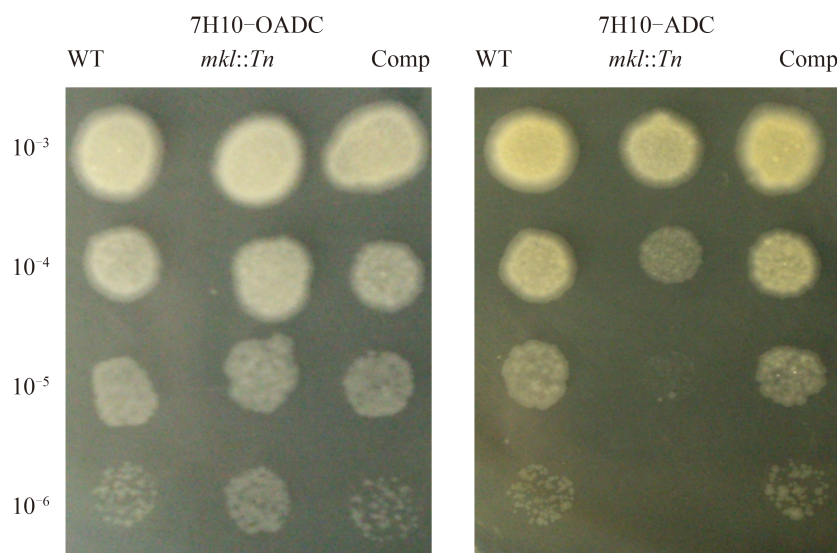


图 3. 野生株、突变株和互补株在7H10-OADC和7H10-ADC固体培养基上的生长情况

Figure 3. The growth of WT, mutant and complement strains in 7H10-OADC or 7H10-ADC agar plates. Results are representative of triple experiments.

酸结合载体又可分为3类：脂酰CoA去饱和酶、脂酰ACP去饱和酶和脂酰-脂去饱和酶<sup>[15]</sup>。分枝杆菌DesA3蛋白是膜结合的硬脂酰CoA去饱和酶，通过脱氢反应生成C18:1 $\Delta^9$ 不饱和脂肪酸(即油酸)<sup>[16]</sup>。油酸是分枝杆菌中含量最多的不饱和脂肪酸，是合成细胞膜磷脂和甘油三酯的重要前体物质。在正常温度条件下，单纯含有饱和脂肪酸的磷脂不能形成脂双层结构，只有含有一定比例的不饱和脂肪酸，才能降低膜的熔点，维持膜的流动性，保证正常的生理功能<sup>[17]</sup>。例如，枯草芽孢杆菌中去饱和酶DesA是在16:0脂肪酸的 $\Delta^5$ 位置引入双键，且该去饱和酶的表达受低温诱导，在细菌应对低温等应激条件时发挥重要作用<sup>[18-19]</sup>。本文中的实验也验证了突变株在油酸缺陷的固体培养基中生长一定程度受限，但并非完全不能生长，这表明分枝杆菌内可能存在未知的油酸合成酶，或者DesA3在含量较低时依然发挥一定的作用。20世纪60年代发现的抗结核药物戊氧苯硫脲(Isoxyl)作用靶点之一就是DesA3，该药物通过抑制油酸合成，进而影响分枝菌酸等脂质合成，影响细菌生长<sup>[16]</sup>。基于此，我们预测野生株对

Isoxyl的最小抑菌浓度(MIC)在无油酸条件下会比有油酸条件下降低，而突变株因为本身DesA3表达下降，缺失Isoxyl作用靶点，有或无油酸条件下对Isoxyl的MIC无差异。但遗憾的是，由于海分枝杆菌对Isoxyl表现出了天然耐药，即使在高达100  $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度下野生株和突变株都能生长(结果未显示)，因此难以验证我们的预测。

进一步分析iTRAQ结果发现，多个参与丙酮酸代谢的基因编码蛋白含量改变，其中MMAR\_3408、MMAR\_3410、MMAR\_3489、MMAR\_4046 (AceE\_1)等下调，MMAR\_4787、MMAR\_4912、MMAR\_3340 (AccD6)、MMAR\_4393 (FadA3)等上调。丙酮酸作为糖酵解的产物，可进一步生成苹果酸、醋酸或乳糖参与到碳源循环中，是代谢通路中的重要分子。缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成通路中也有多个基因编码的蛋白含量下调，包括MMAR\_1710 (IlvB1)、MMAR\_1711 (IlvN)、MMAR\_1712 (IlvC)和MMAR\_5225 (LeuA)。IlvB和IlvN分别是乙酰乳酸合成酶的催化亚基和调节亚基，是催化从丙酮酸生物合成支链氨基酸的第一步反应的关键酶<sup>[20]</sup>，而LeuA则是亮

氨酸合成通路中的关键酶。此外还有多个脂肪酸代谢通路中的蛋白含量发生改变, 如MMAR\_0986 (FadD2)、MMAR\_1240 (Pcd)、MMAR\_1509 (FadE23)、MMAR\_2071 (FadD11)等蛋白含量下降, MMAR\_0488 (FadE4)、MMAR\_4393 (FadA3)等蛋白含量升高, 提示*mkl*突变株可能存在脂质成分的改变, 进而影响其生理状态和功能。之后研究*mkl*基因功能或许可以从碳源代谢、脂质代谢等寻找切入点。

综上所述, 本研究通过iTRAQ定量蛋白质组学方法分析了海分枝杆菌*mkl*突变株的差异表达蛋白谱, 提示油酸合成、脂质代谢等通路可能受到影响, 为探索*mkl*的基因功能提供了新的线索。

## 参考文献

- [1] Pozos TC, Ramakrishnan L. New models for the study of *Mycobacterium*-host interactions. *Current Opinion in Immunology*, 2004, 16(4): 499–505.
- [2] Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 2001, 152(3/4): 211–229.
- [3] Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 449–467.
- [4] Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(2): 317–364.
- [5] Joshi SM, Pandey AK, Capite N, Fortune SM, Rubin EJ, Sasseti CM. Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(31): 11760–11765.
- [6] Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(11): 4376–4380.
- [7] Hua YF, Wang QL, Niu C, Gao Q. The potential role of *Mycobacterium marinum mkl* gene in bacterial resistance to the host immunity. *Journal of Microbes and Infections*, 2015, 10(3): 173–179. (in Chinese)
- 华亦斐, 王晴岚, 牛辰, 高谦. *mkl*基因在海分枝杆菌抵抗宿主免疫中的作用. *微生物与感染*, 2015, 10(3): 173–179.
- [8] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154–1169.
- [9] Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, Pandhal J, Smith D, Pham TK, Karunakaran E, Zou X, Biggs CA, Wright PC. An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(4): 1011–1027.
- [10] Shui WQ, Gilmore SA, Sheu L, Liu J, Keasling JD, Bertozzi CR. Quantitative proteomic profiling of host-pathogen interactions: the macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* lipids. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(1): 282–289.
- [11] Xu DD, Deng DF, Li X, Wei LL, Li YY, Yang XY, Yu W, Wang C, Jiang TT, Li ZJ, Chen ZL, Zhang X, Liu JY, Ping ZP, Qiu YQ, Li JC. Discovery and identification of serum potential biomarkers for pulmonary tuberculosis using iTRAQ-coupled two-dimensional LC-MS/MS. *Proteomics*, 2014, 14(2/3): 322–331.
- [12] Forrellad MA, McNeil M, de la Paz Santangelo M, Blanco FC, García E, Klepp LI, Huff J, Niederweis M, Jackson M, Bigi F. Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2014, 94(2): 170–177.
- [13] Cantrell SA, Leavell MD, Marjanovic O, Iavarone AT, Leary JA, Riley LW. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the mce1 operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(5): 619–626.
- [14] Glickman MS, Cox JS, Jacobs Jr WR. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Cell*, 2000, 5(4): 717–727.
- [15] Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1998, 1394(1): 3–15.
- [16] Phetsuksiri B, Jackson M, Scherman H, McNeil M, Besra GS, Baulard AR, Slayden RA, DeBarber AE, Barry III CE, Baird MS, Crick DC, Brennan PJ. Unique mechanism of action of the

- thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(52): 53123–53130.
- [17] Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 222–233.
- [18] Weber MHW, Klein W, Müller L, Niess UM, Marahiel MA. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1321–1329.
- [19] Aguilar PS, Cronan Jr JE, de Mendoza D. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2194–2200.
- [20] Choi KJ, Yu YG, Hahn HG, Choi JD, Yoon MY. Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4903–4910.

## Quantitative proteomic analysis of *mkl* gene function in *Mycobacterium marinum* using iTRAQ

Xujun Shi, Chao Zhao, Chen Niu, Qian Gao\*

MOE & MOH Key Laboratory of Medical Molecular Virology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** [Objective] To identify differentially expressed proteins in *Mycobacterium marinum* wild-type (WT) and *mkl::Tn* mutant strains, and provide new clues for exploring the functions of *mkl* gene. [Methods] Cellular proteins were extracted from cultures of *M. marinum* WT and *mkl::Tn* strains, and labelled with isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) 4-plex. Differentially expressed proteins were identified with LC-MS/MS and subjected to biological information analysis. [Results] A total of 566 differentially expressed proteins were revealed, among which 232 proteins were up-regulated (ratio  $\geq 1.4$ ) and 334 proteins were down-regulated (ratio  $\leq 0.7$ ). These proteins are mainly associated with lipid metabolism, cell wall and cell processes, intermediary metabolism and respiration, and hypothetical proteins. The most down-regulated protein DesA3, is a fatty acid desaturase and involved in the synthesis of oleic acid. Further experiments showed that the growth of *mkl::Tn* strain was attenuated on 7H10-ADC agar plate without oleic acid, suggesting that *mkl* may play a role in the biosynthesis of oleic acid. [Conclusion] Differentially expressed proteins were identified in *M. marinum mkl::Tn* compared to WT, and these results shed light on the mechanisms of *mkl* gene in mycobacterial pathogenesis.

**Keywords:** *Mycobacterium*, quantitative proteomics, iTRAQ, *mkl* gene

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271790, 81201256)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54237195; E-mail: qiangao@fudan.edu.cn

Received: 14 December 2015; Revised: 17 January 2016; Published online: 11 March 2016