

微生物蛋白质组学研究进展*

吴谋胜 彭宣宪

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

Progress in Microbial Proteomics

Wu Mousheng Peng Xuanxian

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

关键词: 微生物蛋白质组学, 定量蛋白质组学, 比较蛋白质组学, 亚蛋白质组学, 基因组学, 生物信息学

中图分类号: Q-1 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)02-0251-04

微生物基因组研究作为人类基因组计划的一部分,对人类基因组计划及微生物学,甚至整个生命科学都产生巨大的影响^[1]。人类基因组测序已经取得突破性进展,现已绘制完毕人类基因组的工作草图,人类基因组计划即将提前完成。目前已采用 DNA/RNA 芯片和基因表达序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)来研究基因组的功能^[2,3]。但随着对基因组研究的深入,人们认识到单纯从基因组信息并不可能完全揭示生命的奥秘。因为蛋白质是生物功能的体现者,这使我们不得不考虑基因编码的蛋白质有什么功能。不仅如此,基因在转录、翻译后产生蛋白质的过程中,存在着转录水平、翻译水平的调控,蛋白质往往还要经过剪接、修饰加工之后,最终才成为有功能的蛋白质,而且不同组织、不同的分化程度、在不同环境下,生物体所表达的蛋白质是不同的。所以单纯从基因组水平上并不能完全揭示生命活动规律。在这种背景下,蛋白质组学(proteomics)应运而生^[4]。蛋白质组学研究主要采用二维电泳技术、物质谱技术和生物信息学等工具^[5]。

微生物蛋白质组学研究的基本目标是鉴定与微生物活动相关的蛋白质。在不同的环境条件下,微生物相关功能基因组得到表达。用二维电泳将其大量的蛋白质进行分离,比较二维电泳图谱的差异,再对这些差异蛋白质进行鉴定,可以确定与微生物生理活动相关的基因,从而阐明微生物基因组功能^[6]。对微生物蛋白质组学尤其是病原微生物蛋白质组学的研究将对生命科学及人类疾病的防治起到关键性的作用。本文将对微生物蛋白质组学研究进展及其意义作一简要概述。

1 胁迫条件下的微生物蛋白质组学

微生物可以适应不同环境,包括极端恶劣环境(极酸、高温、高渗等)。研究其在不同生长环境中的基因表达情况,可以阐明微生物适应环境的分子机制,有助于发现具有明显生物活性的蛋白分子,造福于人类。

* 基金项目: 教育部优秀骨干教师基金资助

作者简介: 吴谋胜(1977-),男,福建泉州人,厦门大学在读研究生,研究方向为微生物蛋白质组学。彭宣宪(1954-),男,江西安福人,教授,博士生导师,通讯作者,现研究方向为蛋白质组学。

收稿日期: 2001-04-09, 修回日期: 2001-07-30 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

目前对微生物蛋白质组学研究相当一部分集中在微生物胁迫生理方面。由于蛋白质组学的特点,决定了它比传统研究微生物胁迫生理的方法更能够深入阐明微生物适应多样化环境的机制。Münchbach 等对大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 的热休克应答进行研究,发现其表达一些已经确定与热休克有关的大分子热休克蛋白,同时发现了与热休克应答有关的新的的小分子热休克蛋白^[7],是对热休克应答研究的有益补充。PhanThanh 等对单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 在乙醇、脱氧胆酸和 SDS 存在下的蛋白质组学分析发现,有一些蛋白质均参与了这些胁迫反应^[8],这表明微生物对胁迫条件的适应可能具有相同的反应机制。而 Mannazzu 等对多型汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 在钒酸盐、铜离子和氧化胁迫条件下的蛋白质组学研究也得出同样的结论^[9]。这对于揭示微生物对恶劣环境适应能力的规律具有重要的意义。Guerreiro 等对苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 模拟自然感染过程中的对数生长早晚期的比较研究,发现了与共生有关的基因,有助于阐明其共生机制^[10]。对流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 和流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) 等病原微生物在培养条件和模拟感染胁迫下的蛋白质组分析对于进一步了解其致病过程具有重要意义。而对高温生活的激烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 嗜热微生物蛋白质组学的研究,有助于寻找高热稳定性的酶类,将极大改善人们的生产活动^[11]。对尿肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等微生物在碳、氮、磷等营养元素缺乏条件下的蛋白质组学研究将有助于阐明微生物在不适于生存的条件下的适应机制^[12,13]。我们在对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的蛋白质组学的研究中,确定了其调节适应不同温度变化的蛋白质组群,有利于阐明微生物生长具有最适生长温度、生长温度和不适温度的分子机理^[14]。

2 病原微生物蛋白质组学

对于病原微生物尤其是基因组已经得到测序的病原微生物的蛋白质组学研究有助于深入了解病原微生物的致病机理,将对新药的开发和新疫苗的研制带来革命性的变化。

比较基因组学是基因组学的重要分支,现已成为研究生物基因组的最重要的策略与手段之一,而比较蛋白质组学同样在蛋白质组学研究中占据重要地位。通过比较蛋白质组学的研究,有助于发现与其致病性有关的基因。Deiwick 等通过对有毒株和无毒株的鼠伤寒杆菌 (*Salmonella typhimurium*) 蛋白质组的比较,确定了致病性基因,而且发现了毒力岛 χ SPI2 调节子^[15]。有关结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis* BCG) 的比较蛋白质组学的研究,对新疫苗的研制和结核病的防治提供了新的思路^[16]。而通过蛋白质组学技术与免疫印迹的结合,已经在患者血清中鉴定了白色链球菌 (*Candida albicans*) 和砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 的免疫原性蛋白质。这些免疫性抗原可作为监测疾病进展的一种指标,将成为研制新疫苗的对象,有助于摆脱传统的疫苗研制的束缚,加快新疫苗的研制^[17,18]。

病原微生物的耐药性已经引起人们的广泛关注。由于蛋白质组学是在整体水平对生命活动动态的全局的研究,因而它提供了研究微生物耐药性一个强有力的工具。采用蛋白质组学方法对微生物耐药性的研究能够全面阐明微生物耐药性机制,寻找新药物靶标,对于研制和筛选新的抗菌药物具有重要的意义^[19]。

3 微生物生理的定量蛋白质组学

在对微生物的蛋白质组进行研究过程中,已经发现与微生物生理有关的蛋白质被诱导表达。我们采用动态观察方法,研究了与嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 新陈代谢有关的蛋白质组群,为阐明微生物生长的生理规律提供了一条新途径^[20]。目前,更重视研究生理相关蛋白质表达量上的变化,因而必须对这些蛋白质进行定量分析。研究定量蛋白质组学的方法主要有两种。一种是在实验组培养基中直接加入稳定性同位素(主要有²H,¹³C,¹⁵N等)进行标记,而与对照组微生物合成的蛋白质相比较而言,二者合成的蛋白质具有相同的物理化学性质,只是分子量的细微不同,前者较重,而后者较轻,将二-

者的同一目的蛋白质混合,再通过质谱分析,根据两者质谱峰值比就可以确定该蛋白质在不同条件下的相对表达量。另一种方法则是在微生物的蛋白质样品进行分离后,再加入同位素标记的亲亲和标签(isotope-code affinity tags, ICAT)。它是用一个连接子将生物素和一个可以与巯基特异反应的活性基团相连而成的一个复合分子。实验组加入的 ICAT 中连接子的 H 原子被 8 个氘所替换(d8-ICAT),对照组加入的 ICAT 则无同位素标记(d0-ICAT)。ICAT 可特异地使蛋白质中的 Cys 残基发生烷基化,然后再将实验组与对照组的同一目的蛋白质混合,进行酶解,亲和分离后再通过质谱确定“重”(d8-ICAT 标记)和“轻”(d0-ICAT 标记)的质谱峰值比,以确定该蛋白质在不同条件下相对表达量变化。与前一种方法相比,由于 ICAT 是在样品分离后加入的,因而可先将目的蛋白进行分离与富集,这样就解决了定量蛋白质组学的瓶颈——微量表达蛋白质的定量分析。同时它也适用于高等动物的定量蛋白质组学,具有广阔的应用前景^[21]。

4 微生物亚蛋白质组学

目前的蛋白质组学技术还没有办法完全确定微生物基因组表达的所有蛋白质,同时,在许多情况下我们也完全没有必要分析基因组表达的所有蛋白质以获取我们所需要的信息。因此,通过对微生物亚蛋白质组学的研究,也可以进一步阐明微生物重要生理过程的基本信息。Houry 等采用免疫沉淀和蛋白质组学技术分析了 GroEL 的胞内底物,发现 GroEL 参与大约 300 种新翻译多肽的形成^[22]。Mogok 等采用同样的方法研究了大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的热稳定蛋白组分从而确定了 DnaK 系统是一个非常有效的抗聚集的伴侣分子^[23]。对大肠杆菌核糖体的研究可以对某一蛋白的折叠动力学以及与核糖体相互作用的其它组分进行研究。目前还有关于其它微生物亚蛋白质组学如调节子、刺激子、核酸结合蛋白的研究^[24]。病原微生物膜蛋白尤其是外膜蛋白可能在致病过程中起着重要的作用,它也可诱发宿主的特异性和保护性免疫反应,因而研究病原微生物的膜蛋白具有重要意义。但由于膜蛋白的疏水性等特殊性质,给分离膜蛋白带来了困难。Molloy 等改进了膜蛋白的二维电泳技术,所获得的膜蛋白数是从大肠杆菌基因组预测的外膜蛋白质总数的 80%^[25]。该技术将为研究病原微生物的致病机制和疫苗的研制起到重要的作用。

5 基因工程微生物蛋白质组学

微生物基因组虽然取得了巨大成绩,对已测序的微生物序列分析表明尚有二分之一的基因功能未知。蛋白质组学只是在蛋白质水平上对生命现象进行研究,但单从蛋白质水平是不够的,它还要与遗传学、分子生物学和生物物理学等学科相结合,才能了解整个基因组的功能,从而全面地阐释生命的本质。

De Backer 等通过基因敲除技术将白色链球菌的 CGT1 基因去除,意外发现白色链球菌的蛋白组发生变化,且敲除后的白色链球菌对潮霉素 B 和高温具有抗性,从而阐明了与 CGT1 基因有关的生理活动^[26]。Guerreiro 等也通过蛋白质组学结合基因突变技术研究了大豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)胞外多糖合成基因(pssA)的功能,研究发现,pssA 突变引起了 20 多种基因表达水平的上升^[27]。而 Antelmann 等则结合了转录分析技术研究了枯草杆菌在磷缺乏条件下的蛋白质组,发现了 pho 调节子的新成员 glpQ 和 ydhF,从而进一步阐明了 pho 调节子的功能^[13]。这些研究说明了蛋白质组学结合其它生物学技术对全面阐明微生物基因组功能起着重要作用。

6 微生物蛋白质组学与基因组学和生物信息学

随着人类基因组测序的完成,各类生物信息学数据库急剧增长,生物信息学日益成为生命科学研究的强有力工具。随着生物信息学的发展,当前的人类及模式生物的基因克隆可通过生物信息学的帮助来实现。运用生物信息学与基因组学的技术将提供一种快速克隆人类基因的途径^[28, 29]。而当蛋白质组学与基因组学和生物信息学相结合,将极大加快生命科学研究的进程。Chakravarti 等提供了这样的例

子,他们先通过生物分析软件对流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的基因组进行分析,找到了可能编码某外膜蛋白的基因。通过蛋白质组学的方法对流感嗜血杆菌蛋白质组进行分析,鉴定了该蛋白质为可能被研制为新疫苗的外膜蛋白 P6,对于新一代流感嗜血杆菌疫苗的研制起到促进作用^[30]。同样它也可用于其它类型疫苗的研制。结合了生物信息学和基因组学的蛋白质组学将为人类疾病的防治起着重要作用。

7 展望

随着微生物蛋白质组学研究的深入,它将对微生物学和医学的研究起到积极的促进作用。对于模式微生物蛋白质组学的研究将为原核生物及真核生物提供一个研究基因和基因组功能的模式。而要彻底阐明微生物基因组功能,单靠蛋白质组学是不够的,它必须与基因组学,生物信息学和遗传学等学科结合,最终才能从基因组学—转录组学—蛋白质组学—代谢组学四个层次上对微生物基因组功能进行全面阐述。

参 考 文 献

- [1] 阚凤玲,陈文新.微生物学报,2000,40(3):331~333.
- [2] Marshall A, Hodgson J. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 27~31.
- [3] Velculescu V E, Zhang J S, Zhu J S, et al. *Science*, 1995, 270: 484~487.
- [4] 李 林.生物化学与生物物理进展,2000,27(3):227~231.
- [5] 成海平,钱小红.生物化学与生物物理进展,2000,27(6):584~588.
- [6] Washburn M P, Yates III J R. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3: 292~297.
- [7] Münchbach M, Dainese P, Staudenmann W, et al. *Eur J Biochem*, 1999, 263: 39~48.
- [8] Phan Thanh L, Gornon T. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1464~1471.
- [9] Mannazzu L, Guerra E, Ferretti R, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1475: 151~156.
- [10] Guerreiro N, Djordjevic M A, Rolfe B G. *Electrophoresis*, 1999, 20: 818~825.
- [11] Cash P. *Analytic Chimica Acta*, 1998, 372: 121~145.
- [12] Leboeuf C, Leblanc L, Auffray Y. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(20): 5799~2805.
- [13] Antelmann H, Scharf C, Hecker M. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(16): 4478~4490.
- [14] 吴谋胜,彭宣宪,王三英.海洋科学(待发表).
- [15] Deiwick J, Hensel M. *Electrophoresis*, 1999, 20: 813~817.
- [16] Jungblut P R, Schailbe U E, Millenkopf H J, et al. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(6): 1103~1117.
- [17] Pitarch A, Pardo M, Jimenez A, et al. *Electrophoresis*, 1999, 20: 1001~1010.
- [18] Sanchez-Campillo M, Binni L, Comanducci M, et al. *Electrophoresis*, 1999, 20: 2269~2279.
- [19] O'Connor C D, Adams P, Alefounder P, et al. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1178~1186.
- [20] 吴谋胜,彭宣宪.水产学报(待发表).
- [21] Gygi S P, Aebersold R. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4: 489~494.
- [22] Houry W A, Frishman D, Eckerskorn C, et al. *Nature*, 1999, 402: 147~154.
- [23] Mogok A, Tomoyasu T, Goloubinoff R, et al. *EMBO J*, 1999, 18: 6934~6949.
- [24] O'Connor C D, Adam P, Alefounder P, et al. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1178~1186.
- [25] Molloy M P, Herbert B R, Slade M B, et al. *Eur J Biochem*, 2000, 267(10): 2871~2881.
- [26] De Backer D M, De Hoogt R A, Froyen G, et al. *Microbiology*, 2000, 146: 353~365.
- [27] Guerreiro N, Ksenzenko V N, Djordjevic M A, et al. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(16): 4521~4532.
- [28] 唐冬生,禹宽平,汤熙翔,等.生物化学与生物物理学报,2000,32(4):364~368.
- [29] 田 芳,陈主初.生命科学,2000,12(2):72~75.
- [30] Chakravarti D N, Fiske M J, Fletcher L D, et al. *Vaccine*, 2001, 19: 601~612.