

结核分枝杆菌培养物不同组份蛋白质组研究*

庄玉辉 何秀云 张小刚 李国利

(中国人民解放军第 309 医院结核病研究室 北京 100091)

阙海萍 刘绍军

(中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所 北京 100085)

摘 要 将结核分枝杆菌 H37RV 株在苏通培养基内 37℃ 培养 21d, 然后将培养物分成上清液 (A)、细胞浆 (B) 和细胞膜 (C) 蛋白质样品。以 pH3.0 ~ 10.0 的 IPG 预制胶条等电聚焦电泳为第一向, SDS-PAGE 为第二向进行双向电泳 (2-DE) 银染。经扫描、计算机处理。A 组份的部分蛋白质斑点采用质谱仪进行蛋白质鉴定。A、B 和 C 3 个组份蛋白质斑点总数分别为 907、884 和 681 3 个组份蛋白质分子量分布基本相似, 约 70.5% ~ 74.4% 在 10 ~ 49kD 之间, 蛋白质等电点 (pH) A、B 两组份分布基本相似, 约 80.9% ~ 83.5% 在 pH3.0 ~ 6.4 之间, 而 C 组份 pH7.6 ~ 10.0 之间的蛋白质斑点数比 A 和 B 两组分略多; A、B 和 C 3 个组份表达丰度较高的蛋白质斑点数占各组蛋白质斑点总数的比例分别为 7.8%、27.4% 和 2.8%, 蛋白质等电点 90.0% 均分布在 pH3.0 ~ 6.4 范围内。B 组份蛋白质分子质量 73.1% 分布在 10 ~ 49kD 之间, 比 A、B 两组份略高。A 组份 14 个蛋白质斑点经肽质量指纹谱分析, 其中 9 个点有同源性的或推测的蛋白质功能, 5 个蛋白质功能不清楚。总之, 初步获得了结核分枝杆菌 H37RV 株在上述体外培养条件下收获的培养物的上清液、细胞浆、细胞膜蛋白质组 2-DE 图谱及其特点, 为该菌功能基因组研究提供蛋白质组信息。

关键词 结核分枝杆菌 H37RV 株, 培养物不同组份, 蛋白质组, 双相电泳分析, 质谱分析

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209 (2002) 03-0275-06

1998 年, 英国 Sanger 中心和法国 Pasteur 研究所科学家联合报告^[1] 结核分枝杆菌 H37RV 株全基因组序列图, 为研究结核病病原菌生物学功能及其与宿主之间的相互关系的本质认识和一些棘手问题的解决提供了分子遗传学基础。在向功能基因组学研究的过渡中, 蛋白质组学的研究是一种很有用的工具。Brooke 等^[2] 报道结核分枝 H37RV 株全细胞裂解沉淀物蛋白质组双向电泳图谱。Rosenkrands 等^[3] 报道, 结核分枝杆菌培养液、细胞壁、细胞浆蛋白质组双向电泳图谱, 蛋白质斑点数分别为 376、413 和 395。本文采用双向电泳技术 (two-dimensional electrophoresis 2-DE) 研究结核分枝杆菌 H37RV 株在一般生理条件下, 培养物上清液、细胞浆和细胞膜 3 种组份完整的蛋白质组图谱及其特点, 并简要讨论双向电泳技术的某些影响因素。

* 国家重点基础研究发展规划 (973) 严重传染病防治基础研究项目资助课题 (G199054104)

作者简介: 庄玉辉 (1935 -) 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事结核病基础领域的研究工作。

收稿日期: 2001-09-17, 修回日期: 2001-12-17

1 材料和方法

1.1 细菌来源

结核分枝杆菌 H37RV 株(编号 :ATCC 93009)来自中国药品生物制品检定所。

1.2 设备

Beckman L7-65 超速离心机(德国, Beckman 公司), UV330 紫外分光光度计(英国, Unicam 公司); IPG Phor 电泳单元、EPS-3501 电源、循环水浴、Hoefler 自动凝胶染色仪均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-ToF-Ms), 为 micromass 公司。

1.3 试剂

pH3~10 线性(Linear, L)18cm 固相 pH 梯度(immobiline pH gradients, IPG)预制胶条、IPG 缓冲液、SDS 缓冲液、低分子量蛋白质标准、2-DE 蛋白质标准试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、脲素、3-丙磺酸(CHAB)、苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 Sigma 公司; N,N,N,N'-四甲基乙二胺(TEMED)、磺乙酰胺购自 Fluka 公司。

1.4 溶液配制

参考文献 4,5 配制。

1.5 细菌培养

结核分枝杆菌 H37RV 株在苏通(Sauton)培养基 37℃ 培养 21d 的液体培养物,按 1% 比例接种于苏通培养基 37℃ 静止培养 21d。按常规鉴定为纯培养物。

1.6 样品处理

基本参照 Mark 等^[6]方法进行,本文略有改进:上述培养物经 5000r/min 离心 10min,其上清液用新华滤纸过滤,经 0.22 μ m 滤膜过滤,适当浓缩,即为上清液蛋白质(A 组份);细菌菌体沉淀物加入生理盐水悬浮后超声波破碎胞壁 12min,破碎物于 4℃、14000r/min 离心 40min,取上清液经 4℃、100 000g 离心 1.5h,超高速离心获得的上清液即为细胞浆蛋白质(B 组份);沉淀物细胞膜,用生理盐水漂洗 3 次,再次离心,沉淀物加入 1% Triton X-100、1mmol/L PMSF、1mmol/L EDTA 溶解细胞膜,于 4℃、20 000g 离心 1h,上清液即为细胞膜蛋白质(C 组份)。

A、B 和 C 3 个组份以 Bradford 法行蛋白定量后,用于 2-DE 分析。

制胶按 SDS 均一胶配方配制凝胶液,分别制成 250mm × 180mm × 0.5mm 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)。

1.7 等电聚焦电泳

将 -30℃ 冷冻保存的 IPG 预制胶条在室温中平衡 10min,在电泳槽中加入 IPG 胶条泡胀液 350 μ L,尔后将 IPG 胶条胶面朝下放入,滴加覆盖液,按以下参数和程序完成等电聚焦电泳:30V,12h,逐渐加大电压,直至达到 35 000V/h,每胶条电流 50mA。

1.8 SDS-PAGE

IPG 胶条平衡后,胶面向下置于 SDS 凝胶上,在 15℃ 电压 200V,电流 20mA,电泳

40min 进行蛋白质转移。随后电压 600V ,电流 40mA 电泳约 2.8h。

用 Hoefer 自动凝胶染色仪编制程序进行银染 ,然后扫描 ,用专业分析软件包对 2-DE 图谱进行分析、比较。根据扫描蛋白质斑点的面积和密度 ,估算每一个斑点的蛋白质含量和占总蛋白的比例(%)。

1.9 蛋白质的肽质量指纹谱的制备

切下含蛋白质胶块 ,加入铁氰化钾和亚硫酸混合液使其由棕色变为无色 ,即脱 Ag₂。双蒸水洗 1 次 ,碳酸氢铵洗 2 次 ,每次 20min ,双蒸水洗 2 次。乙腈脱水至胶块呈白色不透明状 ,干燥。用测序级胰蛋白酶液浸泡胶 ,吸去多余液体 ,37℃ 保温 16h。萃取肽混合物 ,冷冻干燥后 ,用 0.5% 三氟乙酸溶解 ,用于质谱分析。

经胶上原位酶切和质谱分析得到肽质量指纹谱 ,用数据库检索软件与数据库中每种蛋白质的理论肽质量数相比较来鉴定蛋白质。

蛋白质数据库检索程序 :<http://29.85-19.192/profound-bin/webproFound.ere> 和 <http://www.expasy.Ch/tools/peptiden.html>。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌 H37RV 株蛋白质组 2-DE 图谱分析

采用 pI3 ~ 10 ,线性 IPG 预制胶条等电聚集为第一向 ,SDS-PAGE 水平电泳为第二向的电泳体系 ,在上述实验条件下 ,对在苏通培养基内、37℃ 静止培养 21d 的结核分枝杆菌 H37RV 株培养物的上清液(A 组份)、细胞浆(B 组份)、细胞膜(C 组份)蛋白质组进行 2-DE 分析 ,结果见表 1 和图版 I-A、B、C。

表 1 结核分枝杆菌 H37RV 株蛋白质组 2-D 图谱特点

Table 1 The pattern property of proteome 2-DE in *M. tuberculosis* H₃₇RV

Fractions	No. protein spots	pI distribution/ %			M _r (kD)distribution/ %		
		3.0 ~ 6.4	6.5 ~ 7.5	7.6 ~ 10.0	10 ~ 49	50 ~ 89	90 ~ 130
A	907	83.5	12.0	4.5	70.8	22.8	6.5
B	884	80.9	12.2	6.9	70.5	20.7	8.9
C	681	66.4	15.1	18.5	74.4	19.5	6.1

从表 1 和图版 I 看出 ,A、B 和 C 3 个组份的蛋白质斑点总数分别为 907、884 和 681。在 A、B 2 个组份蛋白质中有 24.3% ~ 24.9% 是共有的 ,其余大部分蛋白质有差别。蛋白质分子质量(M_r)3 个组份分布情况基本相似 ,70.5% ~ 74.4% 分布在 10 ~ 49kD 之间。蛋白质等电点分布 ,A、B 2 个组份基本相似 ,80.9% ~ 83.5% 分布在 pI3.0 ~ 6.4 之间 ,即偏酸性侧 ,而 C 组份蛋白质分布在 pI7.6 ~ 10.0 之间占 18.5% ,A、B 两组份蛋白质分别为 4.5%、6.9%。结果说明 ,C 组份蛋白质偏碱性侧比其它两组份略多。

2.2 蛋白质组表达丰度分析

在结核分枝杆菌 H37RV 培养物上清液、细胞浆、细胞膜 3 个组份蛋白质组 2-DE 图谱中 ,经扫描分析 ,依据每个蛋白质斑点面积的大小与密度高低 ,计算机处理 ,估算每个蛋白质含量。本文将蛋白质含量占总蛋白质含量在 1/10⁻² ~ 1/10⁻³ 以上范围内的蛋白质界定为表达丰度较高的蛋白质(见表 2)。 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表 2 表达丰度较高蛋白质 pI、Mr 分布

Table 2 Distribution of proteins pI, Mr for expression level higher

Fractions	No. protein spots	Protein Total proteins / %	pI distribution/ %			Mr (kD) distribution/ %					
			3.0~6.4	6.5~7.5	7.6 以上	10~29	30~49	50~69	70~89	90~109	100~129
A	71	0.66 (0.3~2.3)	94.0	6.0	0	22.5	26.8	22.5	14.0	7.0	7.0
B	242	0.27 (0.6~1.6)	97.5	2.5	0	43.8	29.3	14.5	8.2	1.2	3.0
C	19	1.6 (0.1~3.3)	89.5	10.5	0	31.6	31.6	10.5	10.5	5.3	0

从表 2 看出, A、B 和 C 3 个组份表达丰度较高的蛋白质斑点数占各组份蛋白质斑点总数的比例分别为 7.8%、27.4% 和 2.8%。结果表明, B 组份表达丰度较高的蛋白质斑点数比其它 2 个组份多。3 个组份蛋白质等电点 90.0% 左右分布在 pH3.0~6.4 范围内, 而 pH7.6 以上未见表达丰度较高蛋白质。B 组份蛋白质分子质量分布在 10~49kD 范围内, 尤其 29kD 以下比其它 2 个组份多。

2.3 培养物上清液中部分蛋白质的肽质量指纹谱分析

选取结核分枝杆菌培养物上清液内表达丰度较高的部分蛋白质斑点, 经脱银、酶消化后, 进行肽质量指纹谱分析(表 3)。从二个肽库中检索, 有 5 个蛋白质功能尚需进一步鉴定, 其余 9 个蛋白质都有同源性或推测功能, 特别是 85A 抗原有其重要的免疫学意义。

表 3 结核分枝杆菌培养物上清液中部分蛋白质质谱鉴定结果

Table 3 *M. tuberculosis* proteins identified by mass spectrometry

No. protein spots	sanger Id	Gene name	Experimental mass/kD	Experimental pI	Homology putative	Function
97	-	-	66.9	4.5	unknown	
230	-	-	50.2	3.8	exo-glucanase-Rumino coccus	
220	Rv 3462c	Tig	50.2	3.9	Chaperone protein	
315	-	-	42.0	4.8	flaglin	
422	-	-	36.5	5.8	glutamy amino petidase	
475	0	Tu	31.1	5.0	elongation factor Tu	
485	Rv 3804c	fbpA	31.0	4.7	Antigen 85A	
592	-	-	27.3	4.2	unknown	
617	-	-	27.2	5.7	peptide synthetase	
722	-	mut T/nudix	20.2	6.8	mut t/nudix family protein	
740	Rv 1332	tpx	20.0	3.8	Thiol peroxidase	
734	Rv 2140C	-	19.5	5.5	unknown	
837	Rv 3614c	-	14.0	3.7	unknown	
841	-	-	14.0	4.6	unknown	

3 讨论

双向电泳作为蛋白质组研究的一项重要技术, 是当前用于分析复杂组份蛋白质样品

时分辨率和灵敏度最高的手段之一。其分辨率和灵敏度与蛋白质样品的处理、IEF 和 SDS-PAGE 实验条件、染色方法等诸因素有关。本文在 IPG 等电聚焦预试时,仅采用 pH4 ~ 7 胶条,结果蛋白质斑点,尤其表达丰度较高的蛋白质斑点分离效果不满意。考虑到结核分枝杆菌培养物蛋白质组蛋白质斑点多且分布广泛,使用较长和 pH 范围较宽的胶条,即 pH3 ~ 10 的 18cm 长胶条,分离效果较好。因此,可根据研究目的,适当调整两性电解质缓冲液 pH 范围。蛋白质样品的浓度与上样量也是影响分离效果和灵敏度的又一个重要因素。因为上样量提高,有利低丰度蛋白质的检测,但高丰度蛋白质的斑点过大,影响其它蛋白质斑点的分离和分析。结果表明,对于广谱 IPG 胶条(pH3.0 ~ 10.0),以 15 ~ 25 μ g 为宜。

结核分枝杆菌全菌细胞含有多少种蛋白质迄今尚不清楚,也未见不同组份完整的蛋白质组图谱。近几年来,国外研究者报道的几篇相关文献说明,结核分枝杆菌不同组份蛋白质的种类和含量与分析技术、细菌不同菌株、生长(或培养)条件等密切相关。1992 年,英国 Sally 等^[7]报告,结核分枝杆菌分离株在改良罗氏培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 21d ~ 28d,全菌细胞裂解物经 SDS-PAGE 分析,银染色,仅显现出 30 ~ 40 条带。1997 年,澳大利亚 Brooke 等^[2]报道,结核分枝杆菌 H37RV 株在 7H9 液体培养基内 37 $^{\circ}$ C,震荡培养 21d,全菌细胞裂解沉淀物采用双相电泳技术分析、银染色,其蛋白质图谱含有 638 个蛋白质斑点。这一结果说明,双向电泳技术极大提高了蛋白质分辨率和灵敏度。本文在苏通培养基 37 $^{\circ}$ C 静止培养 21d 的培养物,按严格处理程序分成上清液、细胞浆和细胞膜 3 个组份,采用双向电泳技术,银染色,其蛋白质斑点数目分别为 907、884 和 681,显示了结核分枝杆菌 H37RV 株在此培养条件、样品处理方法及双向电泳技术参数下所获得的较完整的蛋白质组图谱,这有助于结核分枝杆菌功能基因组的研究。分析结核分枝杆菌 H37RV 株 2-DE 图谱,其中 pH 分布范围具有偏酸性特点:A、B 和 C 3 个组份蛋白质 83.5% ~ 66.4%,尤其是表达丰度较高的蛋白质 97.5% ~ 89.5% 分布在 pH3.0 ~ 6.4 范围内。这一特点的生物意义尚不清楚。结核分枝杆菌寄生于宿主肺泡巨噬细胞和单核巨噬细胞内。这些细胞的内环境偏酸性(pH \leq 5.6),且乏氧。与其它一些细菌和肿瘤细胞的蛋白质不同,该菌含酸性蛋白质居多是否与其在细胞内的存活、繁殖、毒力等有关,是值得研究的重大生物学问题。

参 考 文 献

- [1] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al. *Nature*, 1998, **396**: 190 ~ 198.
- [2] Brooke L U, Thelma E A, Daniel R, et al. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 1384 ~ 1392.
- [3] Rosenkrands I, Weldingh K, Jacobsen S, et al. *Electrophoresis*, 2000, **21**(5): 935 ~ 948.
- [4] 赵从建、贾宇峰、丁勤学,等. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(6): 645 ~ 650.
- [5] Gharahdahi F, Weinberg C R, Meagher B S, et al. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 601 ~ 605.
- [6] Mark P M, Ben R H, Bradley J W, et al. *Electrophoresis*, 1998, **19**: 837 ~ 844.
- [7] Sally E M, Susan V W. *Journal of clinical Microbiology*, 1992, **30**(11): 2784 ~ 2787.

Proteomic Analysis of Different Fractions in *M. tuberculosis* Culture

Zhuang Yuhui He Xiuyun Zhang Xiaogang Li Guoli Que Haiping Liu Shaojun

(Tuberculosis Research Laboratory, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract : To provide a basis of molecular genetic analysis of *M. tuberculosis*, the proteomic profiling was prompted. *M. tuberculosis* H₃₇RV was cultured in Sauton medium at 37°C for 3 weeks, harvested and fractionated into three portions: suspension filtration proteins (A), cytosol proteins (B) and membrane proteins (C). These fractions were analyzed by pH3 ~ 10 IPG gradient and SDS-PAGE. The silver-stained technique and gel images were used. Then the image was transferred into 2-DE gel analysis Software. A part of protein spots of expression level higher from the culture filtrate fraction were identified by peptide mass fingerprinting. A total of 907, 884 and 681 protein spots were observed for A, B, C fractions in *M. tuberculosis* H₃₇RV, respectively. Distribution of proteins mass for 3 fractions were principally similar, About 70.5 ~ 74.4 per cent were distributed in the ranges of Mr 10 ~ 49 kD. pI of the proteins for A, B fractions were principally similar, About 80.9 ~ 83.5 per cent were distributed in the ranges of pH 3.0 ~ 6.4, But the number of protein spots for C fraction distributed in the ranges of pH 7.6 ~ 10.0 were more than A, B fractions. The number of protein spots of expression level higher for A, B and C fractions were 71 (7.8%), 24 (2.7%), 19 (2.8%), respectively. 90 per cent from them, pH of the proteins were distributed in the ranges of pH 3.0 ~ 6.4. 73.1 per cent for proteins mass of C fraction were distributed in the ranges of 10 kD ~ 49 kD, which were more than A, B fractions. Nine of the proteins identified in this study appeared to be homology or putative function proteins, but another five proteins were unknown. The proteomic profiling of different fractions in *M. tuberculosis* obtained in here will be provide a basis for detailed analysis of biology functions of the proteins.

Key words : Mycobacterium tuberculosis H₃₇RV, Differential fractions, Proteome, 2-DE, Mass spectrometry

图版说明

Explanation of plate

A. 结核分枝杆菌 H₃₇Rv 株培养物上清液蛋白质组 2-DE 图谱

A. 2-DE pattern of filtrate proteins of *M. tuberculosis* H₃₇Rv culture; Sauton medium, 37°C cultured for 3 weeks, sample load 20 μg, silver stained, pH3.0 ~ 10.0, 907 protein spots visualized;

B. 结核分枝杆菌 H₃₇Rv 培养物细胞浆蛋白质组

B. 2-DE pattern of cytosol proteins of *M. Tuberculosis* culture

The illustration is the same as Fig. A, 884 protein spots visualized;

C. 结核分枝杆菌 H₃₇Rv 株培养物细胞膜蛋白质 2-DE 图谱

C. 2-DE pattern of membrane proteins of *M. tuberculosis* culture

The illustration is the same as fig. A, 681 protein spots visualized.

(见 320 页后图版)