

嗜水气单胞菌耐四环素的蛋白质组学初步研究

陈 川 王三英 彭宣宪*

(厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 采用四环素次抑菌浓度对嗜水气单胞菌进行选择,筛选得到耐四环素的嗜水气单胞菌菌株,其 MIC(最低抑菌浓度)为出发菌株的 8 倍。通过比较对照菌与耐药菌总蛋白质的双向电泳图谱,获得 3 个差异显著的蛋白点。对这 3 个差异蛋白质进行肽质量指纹及其生物信息分析,分别鉴定为核糖体小亚基蛋白、药物排出系统蛋白和乙酸-乙酰辅酶 A 转移酶亚基。文中对嗜水气单胞菌耐四环素的机理进行了初步探讨。

关键词 双向电泳, MALDI-TOF, 四环素, 耐药性, 嗜水气单胞菌

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)03-0396-03

随着抗生素在水产养殖中的广泛使用,耐药性问题不断困扰着水产养殖业。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是一种重要的人兽共患菌^[1],有关其多重耐药性在国内外均有报道^[2,3],其中耐四环素的频率在国内处于中等水平^[3],给水产养殖造成了很大的经济损失。

蛋白质组学是功能基因组研究的一个重要平台,由蛋白质分离技术(如双向电泳技术)、质谱分析技术和生物信息 3 部分组成^[4]。本文以嗜水气单胞菌为研究对象,首先筛选四环素耐药菌,再经双向电泳比较耐药菌与对照菌蛋白质表达的变化,对差异蛋白进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF)分析和数据库检索,旨在初步探索其耐药机理。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

嗜水气单胞菌 PPD(134/91)由新加坡国立大学生物学系 Sin YM 教授惠赠。

1.2 耐四环素嗜水气单胞菌的筛选

按试管双倍稀释法测定药物对细菌的最低抑菌浓度(MIC),将细菌在含 1/2 MIC 药物的 LB 培养基中培养传代,每隔 1d 转代 1 次,第 15 代后转入无药物 LB 固体培养基培养,挑单个菌落在 LB 培养基中培养后测定 MIC,连续传代 5d 后再测定 MIC,以判断耐药菌的稳定性^[5]。

1.3 细菌总蛋白的提取和处理

细菌培养、收集和破碎按文献[6]方法。在超声破碎后的菌液中加入 DNase I(终浓度为 50 μ g/mL)和 RNaseA(终浓度为 20 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 后,加入裂解液处理,12000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清进行双向电泳。

1.4 双向电泳

双向电泳按文献[7]的方法进行。

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(1-D PAGE)

样品按常规 1-D PAGE 的方法处理和电泳。

1.6 质谱样品的制备

比较双向电泳图谱找到差异蛋白,切下 1mm³置于 1.5mL 的 Eppendorf 管中,按文献^[8]的方法处理样品。

1.7 质谱分析

质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM III MALDI-TOF 质谱仪进行分析,采用反射模式,离子源加速电压 1 为 20kV,加速电压 2 为 23kV, N₂ 激光波长 337nm,脉冲 3ns,离子延迟 2000ns,真空度 1.4 $\times 10^{-7}$ Torr,用标准 Marker 峰作为外标校正质谱峰,正离子谱测定,获得肽质量指纹图谱。

1.8 数据库的查询

通过 ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptident 软件 <http://www.expasy.org/tools/peptident.html> 进行查询。查询条件:分子量的误差范围 $\pm 20\%$,肽片段分子量的误差范围 ± 0.5 Da,每个肽允许有一个不完全的裂解位点,物种选择为细菌,离子选择[M+H]⁺和 Monoisotopic,最少匹配肽段数为 4,半胱氨酸为碘乙酰胺处理。

2 结果

2.1 耐四环素菌株的筛选

次抑菌浓度(1/2 MIC)的抗菌药物能诱导细菌产生耐药早已有报道^[5]。嗜水气单胞菌的初始菌的 MIC 为 64 μ g/mL,将嗜水气单胞菌在 1/2 MIC 的 LB 培养基中传代,最终得到了 MIC 为 560 μ g/mL 的耐药菌株,是出发菌株的 8 倍。

2.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

嗜水气单胞菌的耐四环素菌株与对照菌的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱没有明显变化,既没有出现新的蛋白质条带,也没有显著的量的变化。因此,通过 SDS 聚丙烯酰胺凝

基金项目:国家 863 计划(2002AA629050)、福建省自然科学基金(B0110005)、高等学校博士学科点专项科研基金(20010384009)

* 通讯作者。Tel: 86-592-2187987; E-mail: wangpeng@xmu.edu.cn

作者简介:陈川(1977-),男,河北石家庄人,博士研究生,主要从事蛋白质组学研究。E-mail: hyperthermal@sina.com.cn

收稿日期: 2003-07-08, 修回日期: 2003-10-13

胶电泳分析,难以发现耐药性菌与对照菌的差异。

2.3 双向电泳分析

嗜水气单胞菌的耐药性菌与对照菌总蛋白双向电泳图谱见图 1。从图中可见,两张图谱非常相似,蛋白质点主要集中在 pI 6~8, Mr 20~75 kD 的范围内,每个蛋白点在凝胶分离中都得到了较好的分离。对耐药菌与对照菌的蛋白双

向电泳图谱进行比较,发现了 3 个差异明显的蛋白点,分别命名为 Q1、Q2、Q3,其分子量依次约为 22kD、20kD 和 37kD。

采用双向电泳分析软件(Genomic Solutions Investigator HT Analyzer)对差异蛋白的相对含量进行分析,结果见图 2 的柱型图所示。

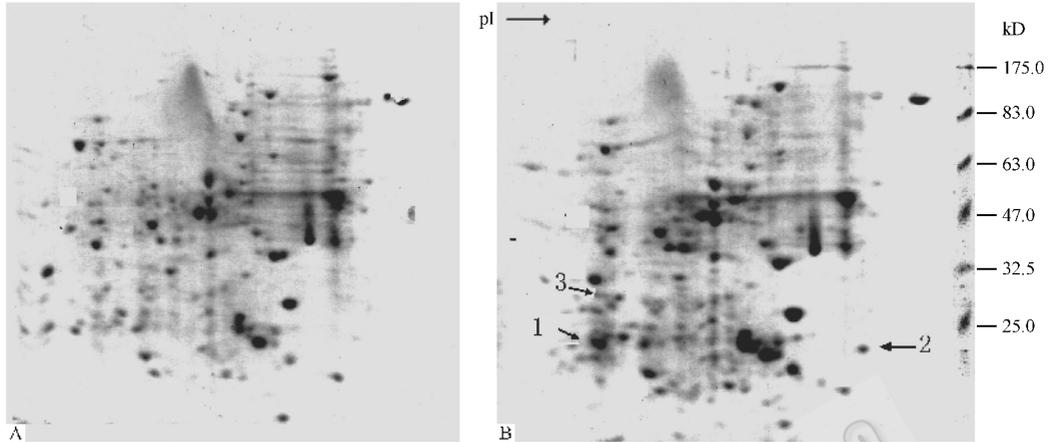


图 1 嗜水气单胞菌的耐药性菌株与对照菌总蛋白质的双向电泳图谱(箭头表示差异点)

Fig.1 2-D PAGE map of the resistant and original strain of Ah

A:Original strain ;B:Resistant strain.

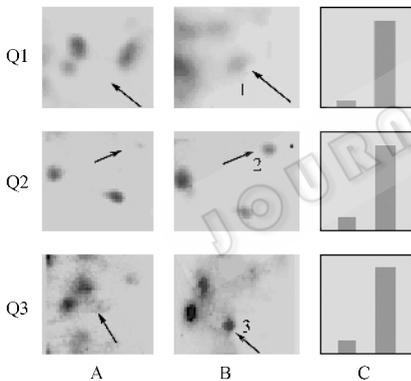


图 2 嗜水气单胞菌的耐药性菌株与对照菌蛋白双向电泳图谱差异点(箭头表示)的放大图谱

Fig.2 Zoom-in map of the proteins of conspicuous variances in 2-D maps

A:Original strain ;B:Resistant strain ;C:Relative content.

2.4 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析

对 3 个差异蛋白进行 MALDI-TOF 分析。根据得到的肽质量指纹图谱数据、分子量范围和其它有关参数,通过 ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptident 软件查询 SWISS-PROT 数据库与之相匹配的蛋白,搜索结果见表 1。

由搜索结果可看出,Q1 为乙酰-乙酰辅酶 A 转移酶亚基;Q2 搜索到都是核糖体亚基的有关的蛋白 S4、S7 等;Q3 搜索到 ABC(ATP-binding cassette)转运器蛋白。

3 讨论

迄今为止,国外已有几篇应用蛋白质组学技术研究人病原菌的耐药性的报道^[9,10],但国内尚无相关研究。本实验采用蛋白质组学技术研究了水产养殖中重要致病菌嗜水气单胞菌四环素耐药菌与非耐药菌的蛋白质表达图谱。结果发现,相互间有 3 个差异显著的蛋白点,分别命名为 Q1、Q2 和 Q3。

表 1 Q1、Q2、Q3 在数据库搜索的结果

Table 1 Database searching results of Q1、Q2、Q3

Protein	Score	Peptide matches	AC	ID	Description	pI	Mw/Da
Q1	0.36	4	P76459	ATOA-ECOLI	Acetate CoA-transferase beta subunit(EC 2.8.3.8)(Acetyl- CoA :acetoacetate CoA transferase beta subunit). - <i>Escherichia coli</i>	5.65	22959.65
Q2	0.25	6	O52759	RS4-PSEAE	30S ribosomal protein S4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	9.94	23277.58
	0.21	5	P58168	RL19-RHIL	50S ribosomal protein L19. - <i>Rhizobium</i>	9.58	19927.62
Q3	0.38	6	Q53193	Y4TR-RHISN	Probable peptide ABC transporter ATP-binding protein Y4TR. <i>Rhizobium</i> sp. (strain NGR234)	8.89	37083.22

Q1 搜索到一个结果为乙酸-乙酰辅酶 A 转移酶亚基,它是脂肪酸合成酶亚基。耐药菌 Q1 表达的变化可能是与膜脂脂肪酸合成有关。当革兰氏阴性菌外膜磷脂双分子层发生变化,使得有亲脂性的四环素渗透率降低,从而降低四环素的通透性。

Q2 搜索到有几个蛋白与之相匹配,都是核糖体亚基蛋白。四环素主要是与 16SrRNA 某些位点结合,其中 S3, S7, S14 蛋白与四环素发生作用^[11]。本实验观察到四环素耐药菌的 Q2 表达的变化,表明这种蛋白与耐药性有关。可能的作用机理是这种蛋白与 16SrRNA 进行正确的折叠有关,降低四环素与 16SrRNA 的结合从而产生耐药性。

Q3 搜索到一个蛋白与之相匹配,即 Probable peptide ABC transporter ATP-binding protein 与 ABC 转运器蛋白有关。ABC 转运膜蛋白已经证明与多种微生物的抗药性有关^[12]。搜索到的蛋白为转运器蛋白,可能是把四环素泵出,使得胞内的四环素浓度降到最低,减少了与 16SrRNA 的作用。

我们使用蛋白质组学技术对嗜水气单胞菌耐四环素菌株的耐药性进行了初步研究,要想对其耐药机理进一步的研究还需要对差异蛋白点源后衰变,MS-MS 质谱以得到蛋白质详细序列信息以便同时在 DNA 的水平来研究其耐药机理。细菌的耐药性是多水平决定的,从实验结果来看,四环素诱导前后发生变化的蛋白,主要为核糖体小亚基蛋白,药物排出系统的蛋白和具有调控功能的蛋白质,这与原来的四环素耐药的报道相一致。这说明使用蛋白质组学的研究方法能迅速的找到差异点,这对研究耐药机理,寻找新的药物靶位提供了一种快速、简便的方法。

参 考 文 献

- [1] 储卫华,陆承平. 培养条件对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶合成与分泌的影响. 南京农业大学学报, 2001, 24(3): 65-68.
- [2] Vivekanandhan G, Savithamani K, Hatha A A M, et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int J Food Microbiol*, 2002, 76: 165-168.
- [3] 李爱华,蔡桃珍,吴玉深,等. 我国鱼类病原——嗜水气单胞菌的耐药性研究. 微生物学通报, 2001, 28(3): 58-63.
- [4] 王三英,吴谋胜,陈晋安,等. 嗜水气单胞菌蛋白质组分子解剖图谱的初步建立. 厦门大学学报, 2003, 42: 139-141.
- [5] 苏林光,贾杰,潘光华. 次抑菌浓度的药物诱导细菌耐药与交叉耐药. 中国抗生素杂志, 1997, 22(4): 301-303.
- [6] 吴谋胜,王三英,彭宣宪. 温度对嗜水气单胞菌蛋白质表达的影响. 海洋科学, 2002, 26(5): 68-71.
- [7] 吴谋胜,彭宣宪. 采用蛋白质组学方法研究嗜水气单胞菌的生长代谢. 水产学报, 2002, 26(1): 42-46.
- [8] 陈子珺,王三英,彭宣宪. 温度对人肺癌细胞 A549 蛋白质表达的影响. 实验生物学报, 2003, 35(3): 179-183.
- [9] Mcatee C D, Hoffman P S, Berg D E. Identification of differentially regulated protein in metronidazole resistant *Helicobacter Pylori* by proteome techniques. *Proteomics*, 2001, 1(4): 5-21.
- [10] Singh V K, Jayaswal R K, Wilkinson B J. Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 199(1): 79-84.
- [11] Poelarends, Gerrit J, Mazurkiewicz, Piotr, et al. Transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, 2002, 1555(1-3): 1-7.
- [12] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性. 上海:华东理工大学出版社, 2001, 227-229.

Analysis of Tetracycline-Resistant *Aeromonas hydrophila* by Proteome Techniques

CHEN Chuan WANG San-Ying PENG Xuan-Xian*

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

Abstract: In the article, the tetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* was selected with antibiotic sub-inhibitory concentration of tetracycline. MIC of the resistant strains was eight times the original strains. To compare with 2-D PAGE of original strains, three proteins were achieved expressing conspicuous variances in resistant strains. By MALDI-TOF-MS and the Peptident software in the SWISS-PROT database, the variances were analyzed and elementarily identified as relevant with ribosomal small unit proteins, drug-discharged system proteins and acetate CoA-transferase beta subunit respectively. Besides, the resistant mechanism of *Aeromonas hydrophila* was elementarily studied.

Key words: Two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF-MS, Tetracycline-resistant, *Aeromonas hydrophila*

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA629050), Fujian Provincial Natural Science Foundation (B0110005), Special Scientific Research Funds for Doctorate-Conferring Subjects in Colleges and Universities

* Corresponding author. Tel 86-592-2183805 E-mail wangpeng@xmu.edu.cn

Received date: 07-08-2003