

# 驱除侵袭大质粒 pINV 对福氏 2a 志贺氏杆菌 2457T 影响的比较蛋白质组学研究

李明珠<sup>1,2</sup> 应天翼<sup>1</sup> 王恒樾<sup>1\*</sup> 张部昌<sup>1,2</sup> 冯尔玲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 军事医学科学院生物工程研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

(<sup>2</sup> 安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

**摘 要** 将福氏志贺氏杆菌 2a 2457T 及其驱除侵袭大质粒 pINV 的菌株培养至对数生长中期,制备了全细胞蛋白质。用双向电泳分离两种细胞蛋白质混合物并进行比较,找出差异点,这些点经过胶内酶切后进行 MALDI-TOF 质谱鉴定。每个蛋白质点的肽指纹图谱都在福氏志贺氏杆菌 2a 2457T 株的蛋白质数据库用 Mascot 进行检索,共发现了 10 个差异表达的蛋白质。结果显示驱除大质粒后几个参与核酸代谢途径的酶表达量有所上升。其中胞嘧啶/脱氧胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和尿嘧啶核苷磷酸化酶表达量的上升可能造成尿嘧啶和尿(嘧啶核)苷合成的增加。

**关键词** 福氏志贺氏杆菌,侵袭大质粒,比较蛋白质组学,双向电泳,质谱

**中图分类号** Q93,Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2005)03-0410-05

近年来,在人类基因组计划的带动下,基因组学与蛋白质组学随之诞生并迅速发展,特别是微生物基因组测序工作得到广泛的开展。到 2003 年 4 月 30 日已经有 130 多种细菌的全基因组序列在网上公布,并从 2003 年起以每个月完成 4~6 个基因组全序列的速度增长,福氏志贺氏杆菌(*Shigella flexneri*) 2a 2457T<sup>[1]</sup>和 30T<sup>[2]</sup>的全基因组序列现在已经完成测定。随着全基因组序列的快速增加与蛋白质组技术的逐渐成熟,蛋白质组学研究蓬勃发展,多种常见病原微生物的蛋白质组参考图谱已经初步建立<sup>[3-9]</sup>,包括福氏志贺氏杆菌在内<sup>[9]</sup>,这为进行病原微生物比较蛋白质组学研究奠定了坚实的基础。痢疾是一种世界范围的传染病,虽然在发达国家很少导致死亡,但在发展中国家每年有一百多万人死于痢疾<sup>[10]</sup>。疫苗是控制直至根除传染病的最佳手段,然而迄今为止仍未研究出理想的能有效控制痢疾的疫苗<sup>[11,12]</sup>。这主要由于人们对志贺氏杆菌的致病机理和宿主的免疫保护机制还不十分清楚。现在已知福氏志贺氏杆菌 2457T 中存在一 218kb 侵袭大质粒,与毒力及侵袭力密切相关,因此引起了人们的普

遍关注。驱除侵袭大质粒后可以使菌株丧失毒力及侵袭力,所以本研究拟对痢疾福氏 2a 2457T 驱除侵袭大质粒 pINV 前后的全菌蛋白质表达谱进行比较,研究去除质粒对细菌的影响,以便进一步深入研究该菌株的毒性调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与培养条件** 本实验所用菌株为福氏志贺氏杆菌 2a 2457T(萘啶酮酸抗性,nal<sup>r</sup>),为本实验室保存菌种,去除大质粒的菌株称为 2457T/inc<sup>[13]</sup>。培养用培养基为 LB(1% 蛋白胨,0.5% 酵母粉,0.5% 氯化钠),培养温度为 37℃,抗生素萘啶酮酸的工作浓度为 25μg/mL。

**1.1.2 主要试剂和仪器** IPG 干胶条、蛋白纯化试剂盒(Plus One 2-D Clean-Up Kit)、蛋白定量试剂盒(2-D Quant Kit)购自 Amersham Pharmacia 公司。蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司。双向电泳第一向等电聚焦仪为 IPGphor(Amersham Pharmacia),第二向垂直板电泳仪为 Protean II X(Bio-Rad)。扫描仪为 Imag-

基金项目 国家 973 项目(G1999054103);国家自然科学基金(30470101);首都 248 重大创新工程(H010210360119)

\* 通讯作者。Tel 86-10-66948836;E-mail:wanghl@nic.bmi.ac.cn

作者简介 李明珠(1981-)男,安徽人,硕士研究生,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail:lmz-lq@163.com

其他作者 王军军<sup>1</sup>,黄留玉<sup>1</sup>

收稿日期 2004-08-23,修回日期:2005-01-07

eScanner 双向电泳凝胶图像分析软件是 ImageMaster 2D Elite3.1 (Amersham pharmacia), 质谱仪是 Reflex-III MALDI-TOF-MS (Bruker)。

## 1.2 菌体全蛋白的样品制备

接种处于对数期的 2457T 和 2457T/inc 于 100mL LB 37°C 250r/min 培养至对数生长中期, 4°C 离心 20min (5000r/min, SIGMA 3K12, Nr. 12150) 收集菌体。用预冷的低盐清洗缓冲液 (3mmol/L KCl, 1.5mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 68mmol/L NaCl, 9mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 洗菌体 3 次后<sup>[14]</sup>, 用预冷的纯水重悬浮并转入 10mL 烧杯。冰浴超声 10min (SONICS VC 750, 大探头, 最大功率的 25%, 脉冲 2s, 停 2s)。在裂解液中加入 1.25mg RNase A 和 50U DNase RQ1, 冰浴 1h。加入 4.2g 尿素, 1.54g 硫脲, 77mg DTT 和 0.4g CHAPS (终浓度分别为 7mol/L、2mol/L、50mmol/L 和 4%), 置室温 1h 以上让蛋白质充分溶解。12000r/min (SIGMA 3K12, Nr. 12154) 离心 10min 去除不溶性沉淀, 取上清用 2-D Quant Kit 测定蛋白质浓度。

## 1.3 双向电泳

IPGphor 第一向等电聚焦电泳主要是依据产品操作手册进行, 并参照 Görg 等<sup>[15]</sup>描述的方法进行一些改进。取 1000 $\mu\text{g}$  样品, 加入 1.75 $\mu\text{L}$  IPC 缓冲液, 后加重泡胀液 (7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 50mmol/L DTT 4% CHAPS, 痕量溴酚蓝) 至总体积为 350 $\mu\text{L}$ 。等电聚焦程序是: 重泡胀 6h, 30V 6h, 500V 1h, 1000V 1h, 8000V 至等电聚焦完成。

第一向电泳后胶条的平衡。准备两管 10mL 的 SDS 平衡缓冲液 (50mmol/L pH8.8 的 Tris-HCl, 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 痕量溴酚蓝), 分别加入 100 毫克 DTT 和 450 毫克碘乙酰胺。胶条在上述两管中分别平衡 10min 和 15min。

第二向 SDS-PAGE 采用恒流方式电泳, 15°C 循环水冷却, 先 10mA/凝胶电泳 15~20min, 待溴酚蓝前沿进入 SDS-PAGE 约 5mm 时将电流加大至 30mA/凝胶。当溴酚蓝迁移至离凝胶底部约 3mm 时终止电泳, 胶浓度为 12.5%。

考马斯亮蓝染色参照《分子克隆实验指南》(第二版)<sup>[16]</sup>进行。

## 1.4 图像扫描和分析

染色完成的双向电泳凝胶经 ImageScanner 扫描仪扫描保存图像。透射扫描, 光学分辨率为 400dpi。

图像分析用 ImageMaster 2D Elite 3.1。蛋白质点的分子量根据同步电泳的蛋白质分子量标准计算, 等电点直接按所用 IEF 胶条的 pH 范围计算。

## 1.5 胶内酶切和 MALDI-TOF 质谱检测

胶内酶切的方法参见文献<sup>[17]</sup>。质谱检测由国家生物医学分析中心来完成。点靶: 将  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸 ( $\alpha$ -CCA) 溶于含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈溶液中, 制成饱和溶液, 离心, 取 1 $\mu\text{L}$  上清与 1 $\mu\text{L}$  肽段提取液等体积混合, 取 1 $\mu\text{L}$  点在 Score384 靶上, 送入离子源中进行检测。检测: 反射检测方式; 飞行管长 3m; 氮激光器: 波长 337nm; 加速电压 20kV; 反射电压为 23kV。

## 1.6 数据库查询

登陆互联网 (<http://www.matrixscience.com>), 用 Mascot 程序在相应数据库中对 MALDI-TOF 质谱检测得到的肽质量指纹图谱进行检索。进入检索界面, 首先选择数据库与种属, 然后根据实验过程来判断蛋白质会经受哪些修饰而作相应的选择: 氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl (C) 修饰、可能的修饰方式选 Oxidation (M) 修饰; 再设定检索时可接受的肽段分子量误差 (一般设为 0.2Da)。最后将肽质量指纹图谱数据通过浏览对应的文本文件或复制全部数值递交给 Mascot 数据框, 点击“检索”图标, 等待网站返回检索结果并保存。网上在线检索选用 NCBI 数据库, 将种属限定为大肠杆菌; 在国家生物医学分析中心本地运行 Mascot 检索时选择福氏 2a 2457T 株基因组数据 (NC-004741.1)。

## 2 结果

### 2.1 福氏志贺杆菌去除大质粒前后双向电泳图谱

福氏志贺杆菌的全菌蛋白从双向电泳的结果来看基本分布在 pH4-7<sup>[12]</sup>, 本试验着重用 pH4-7 的胶条进行研究, 经过多次重复实验认为结果稳定可信, 电泳图经过图像分析软件 ImageMaster 2D Elite 3.1 分析共找出 10 个差异显著的点, 这些差异表达的点是以前驱除大质粒前的全菌蛋白为对照组以驱除大质粒后的为实验组比较产生。其中有 6 个蛋白质点的表达量上调, 4 个表达量下调 (图 1)。

### 2.2 差异蛋白的质谱查询结果

在国家生物医学分析中心本地运行 Mascot 检索时选择福氏 2a 2457T 基因组数据 (NC-004741.1), 得到的检索结果及相应信息 (表 1)。

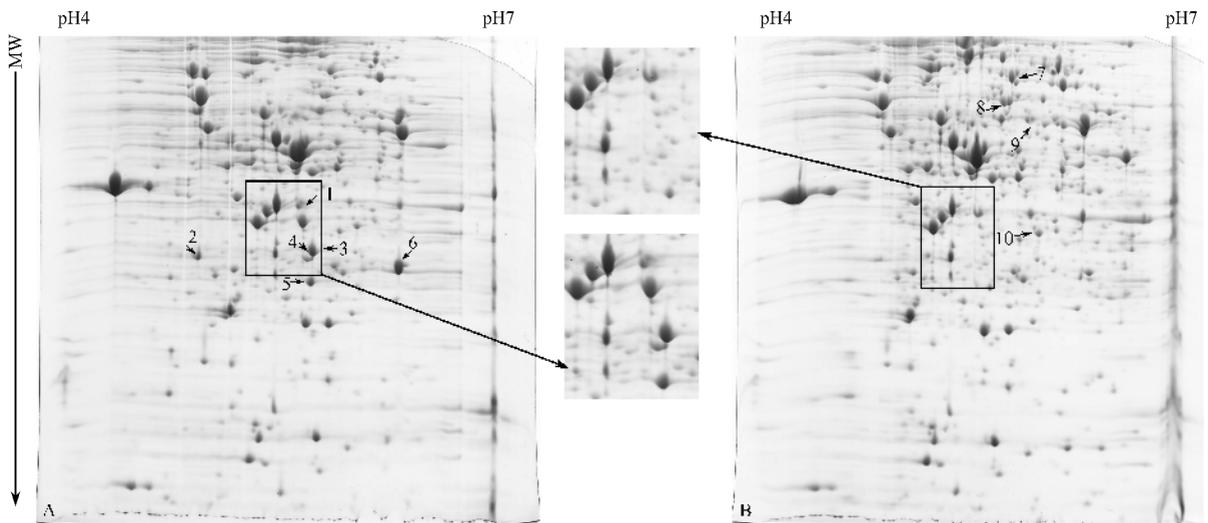


图 1 福氏志贺氏杆菌 2a 2457T 在去除大质粒前后的全菌蛋白差异图

Fig. 1 Interesting spots in 2-D PAGE map about whole cellular protein extracts of *S. flexneri*

Using pH4-7 immobilized pH gradient dry strip and stained with Coomassie Brilliant Blue R250. Arrows indicate the difference. A : Mutant with removal of plasmid pINV ; B : Wild type strain with plasmid pINV.

表 1 差异蛋白质(图 1 所示)的质谱检索结果及相关信息

Table 1 Database searching results and related information of interesting spots mentioned in Fig. 1

No.	Common name	Gene symbol	NCBI GI identifier	Sequence coverage/%	Primary locus	Main role	Subrole
1	Cytidine/deoxycytidine deaminase	cdd	gi 30063587	71	S2357	Purines pyrimidines nucleosides , and nucleotides	Salvage of nucleosides and nucleotides
2	Outer membrane protein Tsx	tsx	gi 30061906	54	S0356	Transport and binding proteins	Nucleosides , purines and pyrimidines
3	Beta-Lactamase Tem1 *	ampC	gi 16131975	90	B4150	Cellular processes	Toxin production and resistance
4	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase	deoC	gi 30065619	57	S4684	Purines pyrimidines nucleosides , and nucleotides	Other
5	Purine-nucleoside phosphorylase	deoD	gi 30065622	66	S4687	Purines pyrimidines nucleosides , and nucleotides	Salvage of nucleosides and nucleotides
6	Uridine phosphorylase	udp	gi 30064872	77	S3845	Purines pyrimidines nucleosides , and nucleotides	Salvage of nucleosides and nucleotides
7	Methionine tRNA synthetase	metG	gi 30063551	41	S2303	Protein synthesis	tRNA aminoacylation
8	Alkyl hydroperoxide reductase , F52a subunit	ahpF	gi 30062064	54	S0530	Cellular processes	Detoxification
9	Dipeptide transport protein	dppA	gi 30065176	52	S4191	Protein fate	Protein and peptide secretion and trafficking
10	ATP-binding protein of oligopeptide ABC transport system	oppD	gi 30062767	64	S1333	Transport and binding proteins	Amino acids , peptides and amines

\* Searched against "Proteobacteria" by mascot (http://www.matrixscience.com).

### 3 讨论

在福氏志贺氏杆菌 2a 2457T 去除大质粒前后的蛋白质组比较中确定了 10 个差异点,对应 10 个蛋白质编码基因。在这些蛋白质中有 6 个蛋白(胞嘧啶/脱氧胞嘧啶脱氨酶、外膜蛋白 T<sub>sx</sub>、β-内酰胺酶、5-磷

酸-2-脱氧核糖醛缩酶、嘌呤核苷磷酸化酶和尿嘧啶核苷磷酸化酶)的表达在去除侵袭大质粒后有明显的上调,同时有 4 个蛋白质(甲硫氨酸 tRNA 合成酶、烷基过氧化氢物还原酶、二肽转运蛋白和多肽 ABC 转运系统中的 ATP 结合蛋白)在侵袭大质粒去除后表达量明显下调。其中胞嘧啶/脱氧胞嘧啶脱氨酶、嘌呤

核苷磷酸化酶和尿嘧啶核苷磷酸化酶参与的嘧啶代谢途径(图 2)。

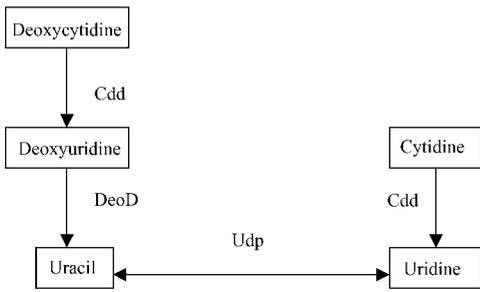


图 2 尿嘧啶的部分代谢途径

Fig.2 Part of the metabolism pathway of uracil

该 3 个酶表达量的上升可能造成尿嘧啶和尿(嘧啶核)苷合成的升高。它们与侵袭大质粒的关系还有待于进一步研究。5-磷酸-2-脱氧核糖醛缩酶也与核酸的代谢有关;另外外膜蛋白 T<sub>5x</sub> 与核苷的转运有关<sup>[18]</sup>。这些蛋白质的高表达可能显示福氏志贺杆菌在大质粒去除后细胞核的活动显著活跃,推测可能是大质粒的存在对细胞核染色体上基因的表达有一定的抑制作用,使得在大质粒去除后染色体上基因的表达活跃起来。另外,5-磷酸-2-脱氧核糖醛缩酶和嘌呤核苷磷酸化酶的基因定位号分别是 S4684( deoC)和 S4687( deoD),在基因组上位于这两个基因中间的两个基因分别为 S4685( deoA)和 S4686( deoB)。这 4 个基因都位于基因组的正链上,说明它们具有相同的转录方向。基因的功能预测表明它们具有相似的功能。双向电泳结果显示 S4684( deoC)和 S4687( deoD)在驱除侵袭大质粒的情况下表达量同步上升,所以推测基因 S4684、S4687 和 S4685、S4686 这 4 个基因可能位于一个操纵子当中,它们的表达可能受侵袭大质粒的影响。 $\beta$ -内酰胺酶的高表达应该是构建 2457T/inc 菌株所引入的小质粒表达造成的,该菌株在构建时利用质粒不相容性原理引入一个背景清楚的小质粒驱除痢疾本身的侵袭大质粒,这里的  $\beta$ -内酰胺酶就是小质粒上的基因表达的<sup>[13]</sup>。

甲硫氨酸 tRNA 合成酶是细胞内蛋白质合成过程中很重要的一种酶<sup>[19]</sup>,该酶在驱除侵袭大质粒的菌株中表达量下调,这可能是由于侵袭大质粒的驱除使得原先由质粒所编码的蛋白质得不到合成表达,而对参与蛋白质合成的甲硫氨酸 tRNA 合成酶的需求也相应减少,可能是造成该酶表达量下调的原因。

二肽转运蛋白和多肽 ABC 转运系统中的 ATP

结合蛋白都是在蛋白质的转运过程中起作用的蛋白质,它们在驱除侵袭大质粒的菌株中表达下调,这可能也是由于侵袭大质粒驱除,菌内原先由大质粒编码的蛋白质没有表达,而相应的多肽转运系统也就减少。

双向电泳是蛋白质组学研究中分离蛋白质混合物的一种十分重要的技术,能够在一张胶上显示上千种的蛋白质,但是相对于细胞内蛋白质组的上万种蛋白质来说,双向电泳也只能粗略的来说明细胞蛋白质组的变化,由于双向电泳技术本身的限制因素<sup>[20]</sup>如对碱性蛋白质和低丰度蛋白质的分离效果不理想等,使得这种技术还急需改进来实现蛋白质组学研究的进一步发展。福氏志贺杆菌的侵袭大质粒与痢疾的毒性相关<sup>[21,22]</sup>,该质粒的驱除应该会使一些毒力因子的表达发生变化,但是我们在这些下调的蛋白中并没有发现毒力因子的变化,这可能是由于双向凝胶电泳本身的分离能力有限或其他限制因素所导致。

本研究只是从全菌蛋白的比较情况来研究侵袭大质粒的驱除对菌本身的影响,研究结果还需要进一步的试验来证实,以从另一个角度来验证和阐明福氏志贺杆菌与其侵袭大质粒之间的关系。

## 参 考 文 献

- [1] Mei J, Goldberg M B, Burland V, et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun*, 2003, **71**: 2775 - 2786.
- [2] Jin Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30** (20): 4432 - 4441.
- [3] Regula J T, Ueberle B, Boguth G, et al. Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *Electrophoresis*, 2000, **21**: 3765 - 3780.
- [4] Ueberle B, Frank R, Hermann R. The proteome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: Comparing predicted open reading frames to identified gene products. *Proteomics*, 2002, **2**: 754 - 764.
- [5] Vandahl B, Birkelund S, Demol H, et al. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*, 2001, **22**: 1204 - 1223.
- [6] Langen H, Gray C, Roder D, et al. Front genome to proteome: Protein map of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 1184 - 1192.
- [7] Fountoulakis M, Langen H, Evers S, et al. Two-dimensional map of *Haemophilus influenzae* following protein enrichment by heparin chromatography. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 1193 - 1202.
- [8] Bumann D, Meyer T F, Jungblut P R. Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics*, 2001, **1**: 473 - 479.

- [ 9 ] Liao X , Ying T , Wang H , *et al.* A two-dimensional proteome map of *Shigella flexneri*. *Electrophoresis* , 2003 , **24** :2664 – 2882.
- [ 10 ] Watson C. Death from multi-resistant shigellosis in Fiji Islands. *Pac Health Dialog* , 2001 , **8** ( 1 ) :99 – 102.
- [ 11 ] Lindberg A A , Pal T. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine* , 1993 , **11** ( 2 ) :168 – 179.
- [ 12 ] Moxon R , Rappuoli R. Bacterial pathogen genomics and vaccines. *Br Med Bull* , 2002 , **62** :45 – 58.
- [ 13 ] 冯尔玲 , 廖翔 , 王恒樑 , 等. 驱除福氏志贺杆菌侵袭大质粒的新方法. *微生物学通报* , 2003 , **30** ( 3 ) :69 – 73.
- [ 14 ] Humphery-Smith I , Guyonnet F , Chastel C. Polypeptide cartography of *Spiroplasma taiwanense*. *Electrophoresis* , 1994 , **15** :1212 – 1217.
- [ 15 ] Gorg A , Obermaier C , Boguth G , *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* , 2000 , **21** :1037 – 1053.
- [ 16 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 , 黎孟枫 , 等译. 第二版. 北京 : 科学出版社 , 1991 , 885 – 886.
- [ 17 ] 廖翔 , 应天翼 , 王恒樑 , 等. 考马斯亮蓝染色双向电泳凝胶内酶切方法的改进. *生物技术通讯* , 2003 , **14** ( 6 ) :509 – 511.
- [ 18 ] Christl M , Erhard B , Angela S , *et al.* Pore-forming activity of the Tsx protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* , 1988 , **263** ( 5 ) :2493 – 2499.
- [ 19 ] Deniziak M A , Barciszewski J. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochim Pol* , 2001 , **48** ( 2 ) :337 – 350.
- [ 20 ] Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics : Old , old fashioned , but it still climbs up the mountains. *Proteomics* , 2002 , **2** :3 – 10.
- [ 21 ] Buchrieser C , Glaser P , Rusniok C , *et al.* The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* , 2000 , **38** :760 – 771.
- [ 22 ] Venkatesan M M , Goldberg M B , Rose D J , *et al.* Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* , 2001 , **69** :3271 – 3285.

## Comparative proteomics research on removing of large invasive plasmid pINV of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T

LI Ming-zhu<sup>1,2</sup> YING Tian-yi<sup>1</sup> WANG Heng-liang<sup>1\*</sup> ZHANG Bu-chang<sup>1,2</sup> FENG Er-ling<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity , Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China )

(<sup>2</sup> School of Life Sciences , Anhui University , Hefei 230039 , China )

**Abstract :** *S. flexneri* 2a strain 2457T and its derivative without large invasive plasmid pINV-2457T were cultured to middle logarithm phase. Whole cellular protein extracts of the two strains were examined by two dimensional ( 2D ) electrophoresis using immobilized pH gradient ( IPG ) technology. After in-gel protein digestion , the different-expressed spots were detected by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry ( MALDI TOF MS ). All the peptide mass fingerprints ( PMFs ) were searched by the program Mascot developed by Matrix Science Ltd. For identifying proteins , databases of *S. flexneri* 2a 2457T was used. Ten proteins with changed expression level were found. Results indicate that expression levels of several enzymes involved in nucleic acid metabolism have risen , and expression increase of deoxycytidine deaminase , purine nucleoside phosphorylase , and uridine nucleoside phosphorylase might lead to increase of uridine and uridine nucleoside synthesization.

**Key words :** *Shigella* spp. , Large invasive plasmid , Comparative proteomics , Two-dimensional ( 2D ) electrophoresis , Mass spectrometry ( MS )

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( G1999054103 ) ; Chinese National Natural Science Foundation ( 30470101 ) ; Capital 248 Key Innovation Project ( H010210360119 )

\* Corresponding author. Tel : 86-10-66948836 ; E-mail : wanghl@nic.bmi.ac.cn

Other authors. WANG Jun-jun<sup>1</sup> , HUANG Liu-yu<sup>1</sup>

Received date : 08-23-2004