

伤寒沙门菌野生型与粗糙型菌体蛋白质的双向电泳分析与研究

康颖倩, 王 和*

(贵阳医学院微生物学教研室 贵阳 550004)

摘 要:了解伤寒沙门菌野生型与粗糙型菌株的菌体蛋白质组成特点,探讨伤寒沙门菌粗糙型变异的遗传学基础。分离提取伤寒沙门菌野生型与粗糙型菌株的菌体蛋白质,聚丙烯酰胺凝胶双向电泳(2D-PAGE)和考马斯亮蓝染色,计算机分析与比较两菌株的蛋白质组成特点及其相关性。伤寒沙门菌野生型与粗糙型具有相似的蛋白质电泳图谱,相似系数为 78%。多数蛋白质斑点分布于 pH 3.0~6.4 之间,并且分子量小于 30kDa。两菌株的蛋白质电泳图谱之间的主要差异共计 36 处,多数差异蛋白质的分子量小于 20kDa。伤寒沙门菌粗糙型与野生型菌体蛋白质组成的差异显示,粗糙型变异绝不仅仅是 O 抗原多糖的缺失,也可发生菌体蛋白质组成的改变与缺失。伤寒沙门菌粗糙型保留了同其亲代野生型菌株一致的绝大多数菌体蛋白质组成,在 2D-PAGE 中形成伤寒沙门菌特征性的基本蛋白质图谱,有助于对粗糙型菌株进行蛋白质分子同源性与变异性的分析与鉴别。

关键词:2D-PAGE;伤寒沙门菌;粗糙型;蛋白质图谱

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-6209(2006)05-0838-03

伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*)是引起人类消化道传染病的常见病原菌,其引起的伤寒病在世界各地长期散在发生甚至形成不同程度的流行。伤寒沙门菌也同其他肠道杆菌一样具有复杂的代谢活动,并且容易发生形态与结构、抗原性、毒力、耐药性以及细胞壁缺陷等特性的变异。王和等^[1-3]报道,伤寒沙门菌在羧苄青霉素的作用下可发生细胞壁缺陷变异,成为能够在非高渗透压培养基内传代培养的稳定的 L 型(Stable L-form)。伤寒沙门菌稳定的 L 型在动物体内及人工培养基传代培养不能自发返祖,但在与细菌型接触培养或噬菌体转导试验中能够发生返祖,恢复与其亲代细菌型一致的特性或成为粗糙型菌株^[2,3]。Braude 等^[4]报道,伤寒沙门菌粗糙型的形成与其细胞壁 O 抗原侧链的多糖缺失有关,尚未见关于伤寒沙门菌粗糙型菌株是否具有基因突变以及菌体蛋白质的组成或结构发生改变。本文采用双向电泳技术分析研究了伤寒沙门菌野生型及其粗糙型菌株的菌体蛋白质,通过计算机对菌株蛋白质电泳的三维形态特点进行了分析,探讨伤寒沙门菌及其粗糙型菌株的 2-DE 蛋白质组成特点以及伤寒沙门菌粗糙型变异的蛋白质分子基础,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 野生型:伤寒沙门菌 H₉₀(*S. typhi*) 本室保存菌种。粗糙型:本室保存菌种 S₁R₅(rough of *S. typhi*) 用接触培养法^[2]诱导伤寒沙门菌稳定 L 型返祖。用营养琼脂培养基每周传一代,共 97 代保存,按文献[5]方法进行形态、培养、生化反应及抗原的检测与鉴定。

1.1.2 试剂和仪器 等电聚焦电泳仪:Etan™ IPGphor II™, Amersham Pharmacia Biotech 公司提供。

1.2 电泳样本制备

用无菌生理盐水分别洗脱营养琼脂培养基培养 24h 的

伤寒沙门菌野生型与粗糙型 4℃ 下 8000g 离心 5min,弃上清后重复洗涤 2 次。取沉淀物混悬于细胞裂解液^[5],冰浴下超声破碎处理,振幅 70%,1min、停 10s、共 1min。2500g 离心 5min,上清液备用。

1.3 蛋白含量的测定

按文献[6]方法取上清液用 Folin-酚试剂法对样品的蛋白质进行定量。分别取各样品 1.0mL,加碱性铜试剂 5.0mL 及酚试剂 0.5mL 混匀 30min 后,在紫外分光光度仪上以波长 280nm 测定吸光度,制备吸光度值为 $A_{\text{野生型}} = 0.101$, $A_{\text{粗糙型}} = 0.075$ 的待测样品。对照标准曲线计算菌体蛋白质溶液的蛋白质浓度,野生型为 87.7mg/mL,粗糙型为 63.0mg/mL。

1.4 等电聚焦电泳

按文献[6~8]方法将 IPG 预制胶条放于溶胀槽内,分别取野生型及粗糙型菌体蛋白质样品 500μg 与上样缓冲液混合,加入 IPG 胶条内进行电泳、蛋白质转移及考马斯亮蓝 R250 染色。

1.5 蛋白质同源性分析

以伤寒沙门菌野生型菌体蛋白质凝胶图像为参考胶,与粗糙型菌体蛋白质凝胶图像配比,将蛋白质含量占总蛋白质含量在 0.5%~2.8% (W/V) 以上范围内的蛋白质界定为表达丰度较高的蛋白质,用 Imagemaster 6.0 软件进行配比分析。根据扫描蛋白质斑点的面积、密度与坐标,估算每一个斑点的蛋白质含量、分子量等电点等信息,同时分析两样本凝胶图像蛋白质斑点之间的同源性和差异性。

2 结果

2.1 蛋白质的 2-DE 图谱

伤寒沙门菌野生型与粗糙型的 2-DE 经 4 次重复试验获得了相似的结果,菌体蛋白质形成基本一致的分布特点。染色可见大小不等、形态与分布不

* 通讯作者。Tel 86-851-6908585, E-mail: cwwbwh@21cn.com

作者简介:康颖倩(1974-),女,贵州贵阳人,硕士,讲师,研究方向为分子生物学。E-mail: kangyingqian@sohu.com

收稿日期:2005-10-26,接受日期:2005-12-05,修回日期:2006-04-07

规则、颜色深浅不均的蓝色斑点,多数集中于凝胶的酸性侧,碱性侧可见少量散在斑点(图1-A、B)。

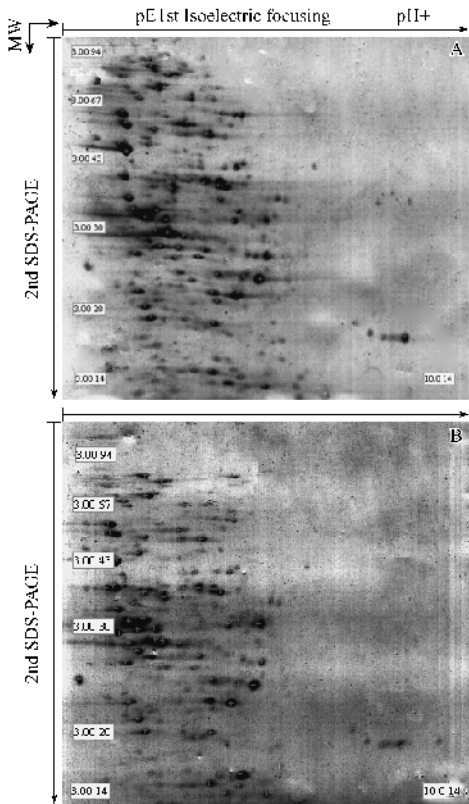


图1 (A)伤寒沙门菌野生型的菌体蛋白质2-DE图谱;(B)伤寒沙门菌粗糙型的菌体蛋白质2-DE图谱

Fig.1 2-DE protein pattern from (A) the wild type of *S. typhi* (B) rough type of *S. typhi*. Sample load: 500 μ g, pH3.0 ~ 10.0 251 protein spots visualized, Coomassie Brilliant R-250 stained.

2.2 蛋白质数量、等电点、分子量的分布

2-DE 结果的 Imagemaster6.0 软件分析可见,野生型菌株蛋白质斑点总数为 251 个,粗糙型菌株蛋白质斑点总数为 226 个。不同菌株的蛋白质分子质量(M_r)分布情况基本相似,48.2% ~ 54.2% 的 M_r 分布 < 30kDa。蛋白质等电点分布也基本相似,84.5% ~ 87.2% 分布于 pH3.0 ~ 6.4 之间。野生型菌株分布于 pH7.6 ~ 10.0 之间的蛋白质占 5.9%,粗糙型在此范围内的蛋白质占 4.8%。

2.3 表达丰度较高的蛋白质 pI 及 M_r 分布

伤寒沙门菌野生型与粗糙型的蛋白质组 2-DE 图谱扫描分析结果显示,各菌株蛋白质两组分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 27.9% 和 31.4%。两组份蛋白质等电点(pI)在 pH3.0 ~ 6.4 范围内的占 93.0% ~ 95.7%。野生型在 pH7.6 以上未见表达丰度较高蛋白质,粗糙型 pH7.6 以上可见表达丰度较高的蛋白质占 2.8%。两组表达丰度较高的蛋白质分子质量在 20kDa 以上分布较均匀。

2.4 野生型与粗糙型的同源性

以伤寒沙门菌野生型菌体蛋白质凝胶图像为参考胶,与粗糙型菌体蛋白质凝胶图像配比,用 Imagemaster 6.0 软件进行配比分析,参考 Imagemaster 2D Platinum 软件用户手册

(Amersham Biosciences, 2003, 151 ~ 152; 157 ~ 158。)方法,经以下公式计算获得两样本蛋白质斑点的相似系数为 78%。

相似系数 = $\frac{2m}{n_1 + n_2} \times 100\%$

(m : 两样本相同的蛋白质的点的总数; n_1 : 一样本中的蛋白质点的总数; n_2 : 二样本中的蛋白质点的总数)

由此得: 相似系数 = $\frac{2 \times 186}{251 + 226} \times 100\% = 78\%$

186 为计算机分析后得出的伤寒沙门菌野生型与粗糙型蛋白质组 2-DE 图谱中的相似蛋白质斑点总数, 251 为伤寒沙门菌野生型蛋白质组 2-DE 图谱中的菌体蛋白质斑点总数, 226 为伤寒沙门菌粗糙型蛋白质组 2-DE 图谱中的菌体蛋白质斑点总数。

软件分析所获得的两凝胶图像蛋白质点群 OD% 的散点图显示,相关系数(correlation coefficient)为 0.782,匹配点为 186 个,所得回归线等式提示两胶蛋白质点数据相关性和拟和度较高,实验偏差性小(图2)。

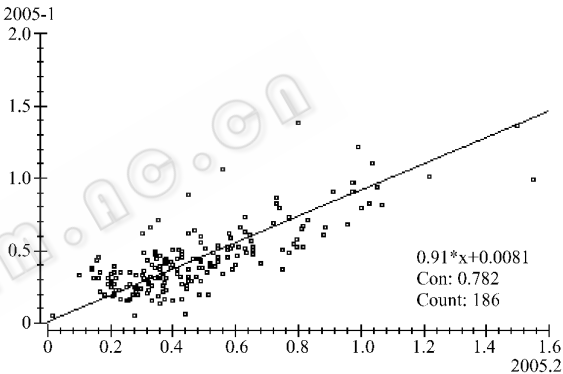


图2 沙门伤寒菌野生型与粗糙型的蛋白质点群的散点图(OD%)

Fig.2 Scatters plot of proteins between wild type and rough type of *S. typhi* (OD%). Note: 0.91 * X + 0.0081; Regression line equation; Corr: correlation coefficient; Count: Number of pairs.

2.5 野生型与粗糙型的典型菌体差异蛋白质

以伤寒沙门菌野生型菌体蛋白质凝胶图像为参考胶,与粗糙型菌体蛋白质凝胶图像配比。Imagemaster6.0 软件配比分析可见两样本主要差异蛋白质点共计 36 处,其中 50.6% ~ 53.1% 差异的蛋白质分子量小于 20kDa。据分析结果计算出每个差异性蛋白质斑点的坐标(设 Y 轴为分子量, X 轴为等电点)、密度、体积等相应参数,获得伤寒沙门菌野生型和粗糙型蛋白质 2-DE 图谱中每个蛋白质斑点的三维图形。在差异蛋白质三维对比图上可见一些呈云雾状、大小不等的蓝紫色斑点,每个斑点对应一种蛋白质,标注的差异性蛋白质在对比图里表现为缺失。

3 讨论

粗糙型变异是细菌最常见的一种变异类型,尤其在伤寒沙门菌以及其他许多革兰阴性肠道杆菌更为常见。粗糙型变异不但可导致细菌丧失其特异性的表面抗原,而且也可导致细菌生长特性、致病性等特性发生改变,从而干扰对于细菌的鉴定以及病原学诊断。Braude 等^[4]报道,许多因素可导致细菌丧失荚膜或菌体 O 抗原以致成为粗糙型菌株,伤寒沙门菌的粗糙型主要同其菌体 O 抗原多糖侧链的缺失有关。

王和等^[2,3]采用 L 型诱导以及接触培养与噬菌体转导试验的方法,成功使伤寒沙门菌稳定 L 型返祖并且获得了粗糙型菌株。这些来自 L 型的粗糙型菌株也同其他机制导致的沙门菌粗糙型菌株一样,丧失了动力以及伤寒沙门菌特异性 O 抗原。通过 SDS-PAGE 方法研究发现,这些粗糙型菌株可形成与其亲代野生型菌株有差异的菌体蛋白质图谱。本文结果进一步证实 L 型返祖形成的伤寒沙门菌粗糙型的菌体蛋白质组成可发生明显的缺失与改变,提示伤寒沙门菌粗糙型变异可能涉及基因的突变或表达异常。

蛋白质是基因的直接产物,其性质、组成、功能等可直接反映基因的结构与功能。基因组资料需要转录水平和蛋白质水平数据的补充,尽管基因表达的微阵列技术可高通量监测基因组 mRNA 表达状况,但是各种生物学因素(例如 mRNA 不稳定性、半衰期短、转录后修饰、共翻译等)的影响,常常可导致 mRNA 水平的检测结果不能够完全代表生物体内蛋白质的实际表达水平。比较蛋白质组学技术结合计算机软件分析,能够对菌株间双向电泳凝胶图谱中蛋白质斑点的等电点、分子量、浓度、三维形态等进行比较与研究,有利于细菌的蛋白质水平分类与研究。文献[9]报道,比较蛋白质学的分析方法既有助于了解和分析生物的代谢功能途径以及表型相关的重要未知蛋白,也有助于深入了解病原微生物、尤其是那些基因组已测序的病原微生物的致病性相关基因及其致病机理以及促进新药的开发和新疫苗的研制。本文结果显示,伤寒沙门菌野生型及其粗糙型菌株的蛋白质在 2-DE 分析中形成了某些特殊的性质,其主要包括:①pH 分布范围具有偏酸性,两菌株表达丰度较高的蛋白质 93.0%~95.7% 分布在 pH3.0~6.4 范围内,但野生型碱性侧的蛋白质数量比粗糙型略多;②菌体蛋白质分子质量(M_r)分布情况基本相似,48.2%~54.2% 分布小于 30kDa,提示该菌种菌体内含

小分子蛋白质较多;③伤寒沙门菌野生型与粗糙型的菌体蛋白质 2-DE 图谱的相似系数为 78%,提示两菌株之间具有较高的同源性;④两菌株主要差异蛋白质点共计 36 处,提示伤寒沙门菌的粗糙型变异绝不仅仅是 O 抗原特异性多糖侧链的缺失,同时也有部分菌体蛋白质的缺失或改变。

参 考 文 献

- [1] 王和,解莉亚,徐英. 用 1640 液培养细菌 L 型的研究. 贵州医药, 1989, 13(6): 324-326.
- [2] 王和,唐七义,徐英,等. 伤寒杆菌和甲型副伤寒杆菌的稳定 L 型返祖性研究. 贵州医药, 1992, 16(4): 197-199.
- [3] 王和,唐七义. 伤寒杆菌稳定 L 型粗糙型返祖菌的蛋白图谱和抗原研究. 中国微生态学杂志, 1994, 6(1): 28-31.
- [4] Braude AB, Davis CE, Fierer J. Infectious Diseases and Medical Microbiology. London: WB. Saunders company, 1986, 51-56, 1189-1194.
- [5] 李仲兴,郑家齐,李家宏,主编. 临床细菌学. 北京:人民卫生出版社, 1986, 185.
- [6] Gharahdahi F, Weinberg CR, Imai DA, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis, 1999, 20: 601-605.
- [7] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [8] Rosenkrands I, Weldingh K, Jacobsen S, et al. Mapping and identification of mycobacterium tuberculosis proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. Electrophoresis, 2000, 21: 935-948.
- [9] 赵辉,乐军. 比较蛋白质组学在病原菌研究中的应用价值. 国外医学生物化学与检验学分册, 2004, 25(4): 352-353.

Analysis and research of the proteins for the wild type and the rough type of *Salmonella typhi* by 2D-PAGE

KANG Ying-qian, WANG He*

(Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract To find out the protein properties of the wild type and the rough type of *Salmonella typhi* (*S. typhi*); to probe the genetic mechanism of the rough variation of *S. typhi*. The proteins were separated from the wild type and the rough type of *S. typhi*, and then the samples were processed by 2D-PAGE and stained by Coomassie Brilliant R-250. The properties and relationship of the protein patterns were analyzed by the software Imagemaster 6.0. By the 2D-PAGE, the similar protein patterns with 78% Sd (similar data) would be found between the wild type and the rough type of *S. typhi*. The distribution of most protein spots was in the range of pH 3.0~6.4 where the molecular weight of protein was smaller than 30kDa. According to the characters of differential proteins, there is not only the polysaccharide side chain of the O antigen but also some proteins that could be lost or changed in the rough strain of *S. typhi*. Most proteins in it would be the same as those in the parental bacteria so that the characteristic protein pattern of *Salmonella* can be found by 2D-PAGE. This property is useful for analysis and identification of the homologue between variations and their parental bacteria.

Keywords 2-D PAGE; *Salmonella typhi*; Rough type; Protein pattern

* Corresponding author. Tel 86-851-6908585; E-mail: cwwbwh@21cn.com

Received: 26 October 2005/Accepted: 5 December 2005/Revised: 7 April 2006