

定量蛋白质组学分析链霉素耐药和敏感结核分枝杆菌临床分离株

朱传智¹, 赵雁林², 黄香玉¹, 逢宇², 赵雅贞¹, 庄玉辉¹, 何秀云^{1*}

¹解放军第三〇九医院, 器官移植与免疫调节北京市重点实验室, 北京 100091

²中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心, 国家结核病参比实验室, 北京 102206

摘要: 【目的】发现结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 链霉素耐药相关的潜在菌体蛋白。【方法】以结核分枝杆菌临床分离链霉素敏感株 01105 和结核分枝杆菌 H37Rv 为对照, 采用 iTRAQ 技术和生物信息学鉴定并相对定量结核分枝杆菌临床分离链霉素耐药株 01108 菌体蛋白, 并通过 WEGO 功能注释聚类分析 01108 菌株差异表达蛋白的细胞组分、分子功能和生物进程。【结果】01108 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 菌株比较差异表达蛋白为 194 个和 146 个, 01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较均差异表达蛋白 121 个 (共同差异表达蛋白)。差异表达蛋白理论相对分子量和等电点分布广泛, 其生物进程主要参与中间代谢、呼吸作用和脂质代谢, 分子功能主要为催化活性功能和结合功能。共同差异表达蛋白: 7 个核糖体蛋白 (Rv2785c, Rv0056, Rv0641, Rv0652, Rv0701, Rv1630 和 Rv2442c) 在 01108 菌株中表达下调; 7 个蛋白在 01108 菌株中显著差异表达 (上调大于 1.20 倍或下调小于 0.55 倍), 分别为巯基过氧化物酶 (Rv1932)、酰基载体蛋白脱氢酶 (Rv0824c)、30S 核糖体蛋白 S15 (Rv2785c)、丙酮酸脱氢酶 E2 部分 (Rv2215)、双组份转录调控蛋白 (Rv3133c) 以及假定未知蛋白 (Rv2466c 和 Rv2626c)。【结论】iTRAQ 发现了链霉素耐药结核分枝杆菌相对于链霉素敏感结核分枝杆菌和 H37Rv 共同差异表达蛋白, 为进一步探讨结核分枝杆菌链霉素耐药机制奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌, 链霉素, 定量蛋白质组学, 同位素标记相对和绝对定量技术

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0154-10

全球结核病疫情严重, 2010 年全球新发结核病患者为 850-920 万例, 其中, 约 29 万为耐多药结核病患者, 中国和印度耐多药患者约占 44%, 但仅约 4000 人接受治疗, 因此, 耐药 (包括耐多药和广泛耐药) 结核病的诊断和治疗面临重大挑战^[1]。

链霉素 (streptomycin, SM) 是一种氨基葡萄糖型

抗生素, 1943 年发现后因其具有抗结核分枝杆菌的特殊作用, 开创了结核病治疗的新纪元。今天, 结核病的治疗依然采用 SM、利福平、异烟肼和吡嗪酰胺的联合化疗。SM 与结核分枝杆菌核糖体 30S 亚基结合, 抑制细菌蛋白质 (酶) 合成。然而, SM 耐药结核分枝杆菌已广泛存在, 结核分枝杆菌核糖体靶位

基金项目: 国家重要传染病科技重大专项 (2008ZX10003-009)

* 通信作者。Tel: +86-10-66775520; E-mail: xwhe@sohu.com

作者简介: 朱传智 (1986-), 男, 湖北广水人, 主要从事结核杆菌蛋白质组学及免疫学研究。E-mail: chuanzhizhu@gmail.com

收稿日期: 2012-09-09; 修回日期: 2012-11-29

突变是 SM 耐药的主要原因,其中编码核糖体 S12 蛋白的 *rpsL* 基因突变 (K43R, K88Q) 占主要,其次是编码 16S rRNA 的 *rrs* 基因突变 (530 茎环和 915 位核苷酸)^[2-3]。但是,仍有约 30% SM 耐药结核分枝杆菌未检测到 *rpsL* 或 *rrs* 基因突变,推测结核分枝杆菌 SM 耐药还存在其他机制^[4-5]。近年研究还发现,乙酰转移酶 *Rv0262c* 基因和 *gidB* 基因突变可导致结核分枝杆菌低水平的 SM 耐药,但是 SM 敏感株也有一定比例检测到 *gidB* 基因突变^[6-7]。寻找与结核分枝杆菌 SM 耐药相关的新蛋白,有助于解析结核分枝杆菌 SM 耐药机制。

定量蛋白质组学能全面定量分析差异表达蛋白,为大范围鉴定蛋白及其复合物提供了有效的途径^[8]。本文采用同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术分析结核分枝杆菌临床分离 SM 耐药株 01108、SM 敏感株 01105 和 H37Rv 的菌体蛋白,通过 Mascot 搜索及生物信息学对蛋白定量分析,并通过 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn>) 功能注释聚类分析差异蛋白细胞组分、分子功能和生物进程^[9]。旨在寻找与结核分枝杆菌 SM 耐药相关的新蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:结核分枝杆菌临床分离 SM 敏感株 01105 (01105 菌株) 和结核分枝杆菌临床分离 SM 耐药株 01108 (01108 菌株),由国家疾病预防控制中心国家结核病参比实验室从结核病患者分离、鉴定(毒力、耐药性和基因型)和保存。用于抽提菌体蛋白的临床分离菌株及 H37Rv 菌体由国家结核病参比实验室提供,菌体经钴 60 照射灭活后,保存于 -80℃ 备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:iTRAQ8 标试剂盒购自 ABI 公司;胰蛋白酶 (Trypsin), Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB) 购自 sigma 公司;Bradford 定量试剂盒购自 Bio-rad 公司;半制备型 HPLC 为日本岛津产品;Nano-LC MicroTOF-Q II 为 Bruker 公司产品;强阳离子交换柱为 Phenomenex Luna 5 u SCX 100Å (250 × 4.60 mm 5 micron), C18 反相色谱柱 (100 mm × 75 μm, 5 micron) 为 Agilent 产品。其他

试剂为进口分装。

1.2 全菌体蛋白提取

灭活的结核分枝杆菌经 1 × PBS (pH 7.4) 洗涤 30 min, 4℃ 15000 × g 离心 30 min。沉淀用 30 mL 裂解液 (Tris-Cl 20 mmol/L, pH 8.5; 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 悬浮,高压均质破碎仪破菌,溶液总体积不超过 50 mL,4 次循环破菌,4℃ 8000 × g 离心 30 min,取 20 mL 上清,加入 5 mL 50% TCA/丙酮 (w/v),冰水浴 2 h,4℃ 15000 × g 离心 30 min,沉淀用 -20℃ 预冷丙酮洗涤 3 次,晾干于丙酮。沉淀即为菌体蛋白样品,冻存于 -80℃ 备用。

1.3 全菌体蛋白复溶及定量

取部分沉淀于 1.5 mL 离心管,加入复溶 Buffer (8 mol/L 尿素,4% Chaps, 30 mmol/L HEPES, pH 8.0 - 8.3),加入 PMSF 至终浓度为 1 mmol/L,EDTA 至终浓度为 2 mmol/L,混匀并放置 5 min,加入 DTT 至终浓度 10 mmol/L;超声 5 min 助溶,15℃ 15000 × g 离心 25 min,上清于 56℃ 水浴 1 h 后取出,迅速加入碘乙酰胺至终浓度 55 - 100 mmol/L,暗室静置 1 h。加入 4 倍体积的预冷丙酮, -20℃ 沉淀 3 h。4℃ 15000 × g 离心 20 min,弃上清。300 μL 的 50% TEAB、0.1% SDS 的溶液复溶沉淀,超声 3 min 助溶,Bradford 定量并用 12% SDS-PAGE 检测总蛋白提取质量。

1.4 蛋白质酶解

每个样品取 100 μg 蛋白,用 50% TEAB、0.1% SDS 溶液补齐至相同体积。每 100 μg 蛋白质样品加入 3.3 μg 胰蛋白酶,37℃ 水浴 24 h。

1.5 肽段的标记

将标记试剂 (113、114 和 121) 平衡至室温,每管标记试剂均加入 70 μL 异丙醇,颠倒混匀分别加入对应样品的酶解肽段中,113 和 114 分别标记临床分离株 01105 和 01108,121 标记 H37Rv。混匀、室温静置 2 h。

1.6 HPLC 分离肽段

标记的样品用 A 液 (25% 乙腈,10 mmol/L KH₂PO₄, 磷酸调 pH 值至 3.0,用 0.22 μm 有机膜过滤) 稀释 10 倍,全部上样,并用 A 液平衡系统 10 - 20 min,流速 1 mL/min。洗脱梯度:0 - 5% B 液 (25% 乙腈,2 mol/L KCl,10 mmol/L KH₂PO₄, 磷酸调 pH 值至 3.0,用 0.22 μm 有机膜过滤),1 min; 5% - 30% B 液,20 min;30% - 50% B 液,5 min;

50% B 液, 5 min; 50% - 100% B 液, 5 min。分部收集样品经 C18 反相色谱柱除盐, 低温抽干, 0.1% 甲酸复溶肽段用于 LC-MS/MS 分析。

1.7 Nano LC-MS/MS 分析

流动相 A 液: 5% 乙腈、0.1% 甲酸; B 液: 乙腈、0.1% 甲酸。洗脱梯度: 0 - 5% B 液, 0 - 10 min; 5% - 45% B 液, 10 - 80 min; 45% - 80% B 液, 80 - 85 min; 80% B 液, 85 - 100 min; 80% - 5% B 液, 100 - 105 min, 5% B 液, 105 - 120 min, 流速为 0.0003 mL/min。Nano LC 分离的样品直接注入 MicroTOF-Q II 质谱仪, MS 扫描范围 m/z 为 300 - 2000, 每个一级谱图自动选择 3 个最强母离子进行串联扫描, MS/MS 扫描范围 m/z 为 200 - 3000, 每组样品质谱鉴定为 3 次重复。

1.8 生物信息学分析

质谱数据经 DataAnalysis 4.0 软件自动分析标峰得到 mgf 文件, 以 SwissProt 下载的结核分枝杆菌数据库为搜索数据库, 通过 Mascot 搜索引擎进行本地搜索, 对蛋白质鉴定打分。固定修饰选为: Carbamidomethyl (C), 可变修饰选为: Gln- \rightarrow pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), iTRAQ8plex (K) 和

iTRAQ8plex (Y); 筛选: $P < 0.05$ 。差异蛋白质质量是以 Mascot 搜库结果为基础, 以 $m/z113$ 和 $m/z121$ 为对照组, 依据 Mascot 的加权方式, 根据一组肽段同位素报告基团的相对含量的比例进行定量, 01108 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 的直接比值显示相对定量结果, 根据不同肽段鉴定次数进行统计学分析从而判定相对定量结果的统计学意义 ($P < 0.05$)^[10]。采用以 SwissProt 结核分枝杆菌数据库为基础的功能注释, 通过 WEGO 功能注释聚类分析差异蛋白细胞组分、分子功能和生物进程。

2 结果

2.1 菌株特征

01105 菌株为北京基因型, 对 SM, 异烟肼、利福平、乙胺丁醇、卡那霉素和氧氟沙星均敏感; 01108 菌株为非北京基因型, 仅对 SM 耐药、而对异烟肼、利福平、乙胺丁醇、卡那霉素和氧氟沙星均敏感。01105 菌株和 01108 菌株毒力相近, 且毒力均高于标准株 H37Rv (表 1)。

表 1 结核分枝杆菌菌株毒力、耐药性及基因型

Table 1 Virulence, drug-resistance and genotype of *M. tuberculosis*

Bacteria	Virulence ^a	Genotype	Drug-resistance					
			INH	RFP	EMB	SM	Kana	OFX
01105 strain	7	Beijing	S	S	S	S	S	S
01108 strain	8	NonBeijing	S	S	S	R	S	S
H37Rv	12		S	S	S	S	S	S

^a: The virulence is inversely proportional to the value; INH: isoniazid; RFP: rifampin; EMB: ethambutol; SM: streptomycin; Kana: kanamycin; OFX: ofloxacin; S: Sensitive; R: Resistance.

2.2 菌体蛋白鉴定及相对定量

Nano-LC MS/MS 鉴定的蛋白质数据进行 Mascot (<http://www.MatrixScience.com>) 分析, 共鉴定到 785 个蛋白质。iTRAQ 同位素报告基团 MS/MS 图谱获得蛋白质定量信息 (如果其中一种蛋白报告基团丢失, 则无相对定量信息), 有比较意义的定量蛋白质共 492 个 ($P < 0.05$)。

01108 菌株与 01105 菌株比较有 194 个差异表达蛋白 ($P < 0.05$), 其中, 01108 菌株表达上调蛋白 10 个 (上调倍数 ≥ 1.20 有 7 个), 表达下调蛋白 184 个 (下调倍数 ≤ 0.55 有 33 个)。01108 菌株与 H37Rv 比较有 146 个差异表达蛋白 ($P < 0.05$),

01108 菌株表达上调蛋白 19 个 (上调倍数 ≥ 1.20 有 8 个), 表达下调蛋白 127 个 (下调倍数 ≤ 0.55 有 18 个) (图 1)。

01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较均差异蛋白有 121 个, 其中 108 个蛋白在两组比较中表达上调或下调一致: 01108 菌株表达上调倍数大于 1.20 倍只有 Rv2466c; 01108 菌株表达下调倍数小于 0.55 的蛋白有 Rv1932、Rv0824c、Rv2785c、Rv2215、Rv3133c、Rv2626c (表 2)。13 个蛋白在两组比较中表达上调或下调不一致: 与 01105 菌株比较上调而与 H37Rv 比较下调的蛋白有 Rv0350 和 Rv0440, 与之相反的蛋白有 Rv2187、Rv2246、

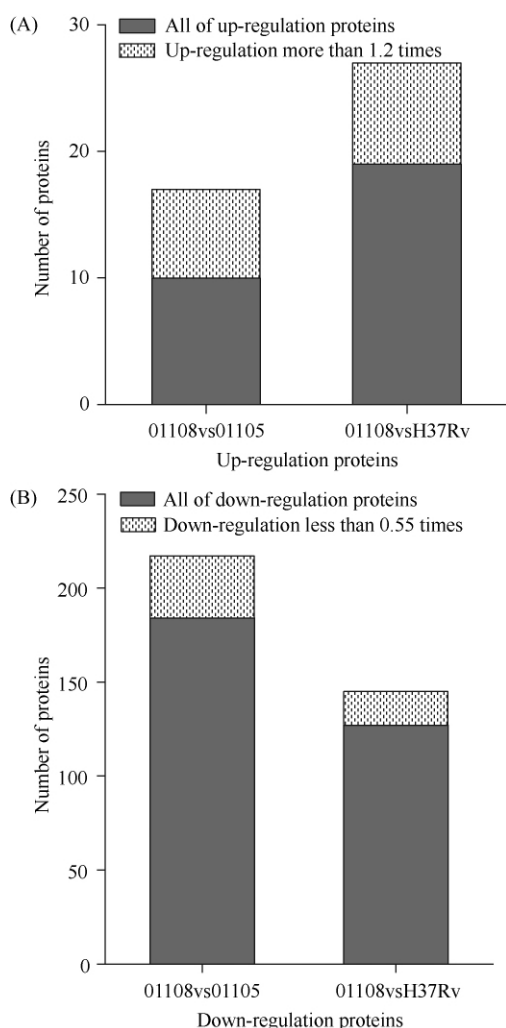


图 1 结核分枝杆菌菌体差异表达蛋白

Fig. 1 The differential expression proteins in whole cellular proteins of *M. tuberculosis*. A: the numbers of up-regulation proteins: total proteins (gray part), up-regulation proteins over 1.2 times (dashed area); B: the numbers of down-regulation proteins: total proteins (gray part), down-regulation proteins below 0.55 times (dashed area).

Rv0958、Rv1326c、Rv2766c、Rv3001c、Rv0831c、Rv2298、Rv0243、Rv0338c 和 Rv0242c (表 3)。

2.3 核糖体蛋白

核糖体蛋白作为链霉素作用靶位点,本文应用 iTARQ 技术共定量 13 个核糖体蛋白。01108 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 比较,30S ribosomal protein S7 (Rv0683) 和 30S ribosomal protein S5 (Rv072) 在 01108 菌株中均无差异表达;01108 菌株分别与 01105 菌株和 H37Rv 的任一比较,50S ribosomal protein L10 (Rv0651)、30S ribosomal protein S3 (Rv0707)、30S ribosomal protein S8 (Rv0718) 和

50S ribosomal protein L6 (Rv0719) 在 01108 菌株中差异表达。其他核糖体蛋白为两组比较在 01108 菌株中共同差异表达(表 4)。同时,这些差异表达核糖体蛋白在 01108 菌株中均为下调表达。

2.4 差异表达蛋白理化性质

基于巴斯德研究所功能分类树 (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>) 分析两组差异表达蛋白的理论相对分子量、等电点以及酶分类。差异表达蛋白质相对分子量和等电点分布广泛,且蛋白酶占两组差异表达蛋白的比例均超过 50%。

差异表达蛋白(01108 vs 01105)的相对分子量(MW)分布为 7.63kDa (Rv1498A) - 326.22kDa (Rv2524c),等电点(pI)分布为 3.74 (Rv2244) - 11.91 (Rv3850)。差异表达蛋白(01108 vs H37Rv)的 MW 最大 224.38kDa (Rv2940c)、最小 7.63kDa (Rv1498A); pI 最小为 4.06 (Rv1827)、最大为 12.48 (Rv2986c)。且两组差异表达蛋白主要富集于 MW40kDa、pI5 左右区域。

2.5 差异表达蛋白质功能分析

根据结核分枝杆菌蛋白功能分类树可将差异蛋白分成 7 类,01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较的差异蛋白功能分类分布基本一致;前者比后者多的差异蛋白数目主要分布在 1 类(脂质代谢)、3 类(细胞壁和细胞进程)、7 类(中间代谢和呼吸作用)和 10 类(保守的假定蛋白质)(图 2)。两组差异表达蛋白均无属于 4 类(稳定 RNAs)、5 类(插入序列和噬菌体)、6 类(PE/PPE)以及 8 类(未知蛋白质)。

2.6 差异表达蛋白 WEGO 功能注释聚类分析

01108 菌株与 01105 菌株比较差异表达蛋白 WEGO 功能注释:其中,分子功能部分以催化活性功能基因(44.44%)和结合功能相关基因(43.48%)为主;在 15 种生物进程中,该组差异表达蛋白参与其中 14 种,主要为新陈代谢、细胞进程和应激反应等。参与新陈代谢过程和细胞进程的基因分别占到 36.04%、6.9%,无基因参与多细胞有机体进程。01108 菌株与 H37Rv 比较差异表达蛋白 WEGO 功能注释分子功能部分与上述结果基本相同,生物进程注释同样以新陈代谢过程(占 34.02%)和细胞进程(占 6.9%)为主,有一基因参与多细胞有机体进程,但无参与生物黏附和生长生物进程的基因(图 3)。

表 2 01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较共同差异表达蛋白 (差异倍数 ≥ 1.20 或 ≤ 0.55)Table 2 The common differential expression proteins (the ratio ≥ 1.2 or ≤ 0.55) in SM resistant 01108 strain compared with both SM sensitive 01105 strain and H37Rv

Rv	Functional Classificatio n ^a	MW	pI	Ec No.	Gene name	Mascot Score	Unique peptide number	Protein description	Differential expression	
									01108 vs 01105	01108 vs H37Rv
Rv2466c	10	23034.97	5.29			174	16	uncharacterized protein BCG_2486c	1.415	1.776
Rv1932	0	16896.09	4.12	1.11.1.-	tpx	463	8	thiol peroxidase tpx	0.394	0.422
Rv0824c	1	38770.06	6.68	1.14.99.6	desA1	191	21	Acyl-[acyl-carrier protein] desaturase desA1	0.498	0.276
Rv2785c	2	10443.12	11.05		rpsO	57	8	30S ribosomal protein S15	0.373	0.459
Rv2215	7	57087.55	4.64	2.3.1.61	dlaT	553	28	Pyruvate dehydrogenase (E2 component) SucB	0.333	0.439
Rv3133c	9	23261.87	5.45		devR	444	4	Two component transcriptional regulatory protein devR (luxR/uhpA-family)	0.365	0.362
Rv2626c	10	15517.67	4.77			262	23	uncharacterized protein BCG_2653c	0.364	0.403

^a: The number represent the functional classification from <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>

表 3 01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较表达上调或下调不一致的蛋白

Table 3 The opposite differential expression proteins in SM resistant 01108 strain compared with SM sensitive 01105 strain and H37Rv, respectively

Rv	Functional Classificatio n ^a	MW	pI	Ec No.	Gene name	Mascot Score	Unique peptide number	Protein description	Differential expression	
									01108 vs 01105	01108 vs H37Rv
Rv0350	0	66830.67	4.59	3.6.1.-	dnaK	1028	2	Chaperone protein DnaK	1.015	0.846
Rv0440	0	56726.52	4.56		groEL2	10750	530	65 kDa heat shock protein (Fragment)	1.171	0.657
Rv2187	1	64002.77	6.16	6.2.1.3	fadD15	147	12	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase FadD15	0.759	1.109
Rv2246	1	46388.58	5.16	2.3.1.41	kasB	370	19	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase 2 kasB	0.963	1.014
Rv0242c	1	46798.01	6.38	1.1.1.100	fabG4	1050	55	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase fabG4	0.775	1.266
Rv0243	1	46075.05	6.64	2.3.1.1	fadA2	398	27	Acetyl-CoA acyltransferase FadA2	0.812	1.153
Rv0958	7	49581.21	5.03	4.99.1.-		212	7	Magnesium chelatase	0.715	1.689
Rv1326c	7	81729.24	5.55	2.4.1.18	glgB	104	30	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	0.827	1.613
Rv2766c	7	27139.97	5.82	1.-.-.-		235	3	short-chain type dehydrogenase/ reductase	0.662	1.149
Rv3001c	7	36089.98	4.8	1.1.1.86	ilvC	274	32	Ketol-acid reductoisomerase	0.889	1.112
Rv0338c	7	95453.42	7.33	1.-.-.-		86	13	iron-sulfur-binding reductase	0.777	1.451
Rv0831c	10	30189.15	4.85			297	29	uncharacterized protein BCG_0884c	0.762	1.081
Rv2298	10	34985.99	9.51			289	25	uncharacterized protein BCG_2314	0.844	1.133

3 讨论

iTRAQ 克服了经典双向凝胶电泳存在低分辨率和低敏感性以及无法对不溶性蛋白质进行分析的缺点,它不仅可以对任何类型的蛋白质进行鉴定(包括高分子量蛋白质,极酸性蛋白质和极碱性蛋白质)并可同时定量多达 8 个样品,从而缩小了不同

样品不同批次间的试验误差,有较好的重复性^[11-12]。同时 iTRAQ 定量鉴定的蛋白数量多于经典双向凝胶电泳^[13]。本文采用 iTRAQ 技术对结核分枝杆菌临床分离 SM 耐药株 01108、SM 敏感株 01105 和标准株 H37Rv 同时进行定量蛋白质组学研究。对 SM 耐药株 01108 与 SM 敏感株 01105 和 H37Rv 鉴定到共同差异表达蛋白 121 个,主要为代谢相关蛋白,包括中间代谢、呼吸作用和脂质代谢(图 2)。

表 4 链霉素耐药结核分枝杆菌临床分离 01108 菌株差异表达的核糖体蛋白
Table 4 The differential expression of ribosomal protein in SM resistant 01108 strain

Rv	WM	pI	Gene name	Protein description	Mascot Score	Unique peptide number	Differential expression ^a	
							01108 vs 01105	01108 vs H37Rv
Rv0056	16169.59	9.66	rplI	50S ribosomal protein L9	252	8	0.597	0.573
Rv0641	24756.32	10.42	rplA	50S ribosomal protein L1	146	17	0.599	0.704
Rv0651	18478.24	8.46	rplJ	50S ribosomal protein L10	179	16		0.564
Rv0652	13440.44	4.3	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	343	23	0.595	0.415
Rv0683	17600.31	11.19	rpsG	30S ribosomal protein S7	36	7		
Rv0701	23090.41	10.91	rplC	50S ribosomal protein L3	101	13	0.666	0.619
Rv0707	29987.79	10.71	rpsC	30S ribosomal protein S3	170	2	0.683	
Rv0718	14411.52	10.66	rpsH	30S ribosomal protein S8	263	1	0.754	
Rv0719	19377.28	10.85	rplF	50S ribosomal protein L6	263	9	0.95	
Rv0721	22888.11	10.85	rpsE	30S ribosomal protein S5	73	6		
Rv1630	53201.69	4.56	rpsA	30S ribosomal protein S1	119	2	0.867	0.694
Rv2442c	11151.08	10.69	rplU	50S ribosomal protein L21	75	7	0.601	0.472
Rv2785c	10443.12	11.05	rpsO	30S ribosomal protein S15	57	8	0.373	0.459

^a: the absence of ratios showed no difference in expression level of given protein.

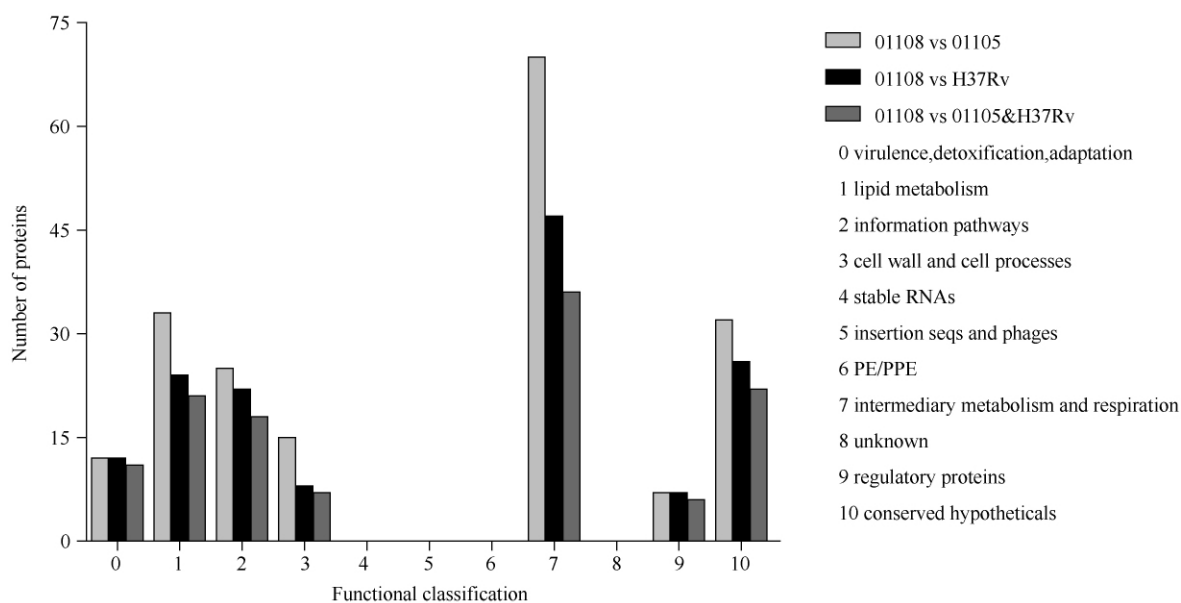


图 2 01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较差异表达蛋白功能分类分布

Fig. 2 The functional classification of the differential expression proteins in SM resistant 01108 strain compared with both SM sensitive 01105 strain and H37Rv.

SM 作为一线抗结核药物,通过与结核分枝杆菌核糖体蛋白作用抑制其蛋白质合成而达到治疗结核病的目的。原核生物 30S 和 50S 核糖体由 55 个蛋白组成,目前只发现结核分枝杆菌 30S 核糖体蛋白 S12 (Rv0682) 编码基因 *rpsL* 突变与其 SM 耐药相关^[2]。结核分枝杆菌临床分离株 SM 耐药较普遍,细菌学药敏试验表明不同地区均发现 SM 耐药结核分枝杆菌临床分离株,且 SM 耐药率呈现高低不一

(4.5% - 88.5%)^[14-15]。大量文献报道采用不同方法检测 SM 耐药结核分枝杆菌临床分离株 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因突变情况^[16-17],因此,一般认为 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因突变是结核分枝杆菌 SM 耐药的主要机制。最近还新发现结核分枝杆菌低水平 SM 耐药与 *gidB* (Rv3919c 蛋白) 突变有关,但 SM 敏感株也发现 *gidB* 突变^[18-19]。本文鉴定到 13 个核糖体蛋白(但无 Rv0682),其中,SM 耐药株 01108 与 SM

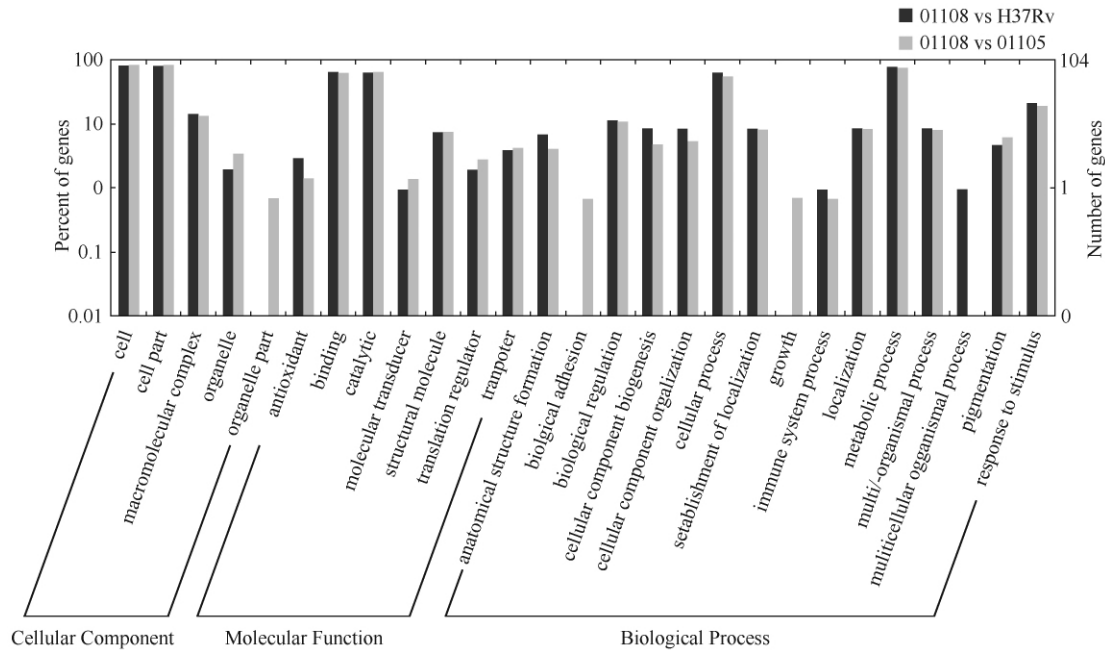


图3 01108 菌株与 01105 菌株和 H37Rv 比较差异表达蛋白的 WEGO 注释

Fig. 3 Classified differential expression proteins in SM resistant 01108 strain compared with both SM sensitive 01105 strain and H37Rv according to WEGO annotations.

敏感株 01105 和 H37Rv 比较,均有差异表达的核糖体蛋白有 7 个、且呈下调表达,它们是 Rv0056、Rv0641、Rv0652、Rv0701、Rv1630、Rv2442c 和 Rv2785c;生物信息学分析发现上述 7 个核糖体蛋白在结核分枝杆菌中均为药物/化合物优先作用靶点 (<http://tdrtargets.org/>)。但这 7 个核糖体蛋白在 SM 耐药株 01108 中下调表达与结核分枝杆菌 SM 耐药的关系,有待进一步试验验证。

结核分枝杆菌还可通过将药物经外排作用泵出细胞外而产生耐药。已有文献报道结核分枝杆菌外排系统 (efflux system) Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c 参与临床分离株对抗结核药物的耐药性, Rv1456c、Rv1457c 和 Rv1458c 蛋白的任一 mRNA 水平显著升高的结核分枝杆菌临床分离株至少耐 SM、异烟肼、利福平、乙胺丁醇任一药物^[20]。针对结核分枝杆菌外排系统的抑制剂体外可降低 SM 等抗结核药物的最低抑菌浓度^[21]。因此,结核分枝杆菌外排系统参与了多种抗结核药物耐药。但本文鉴定在 SM 耐药株 01108 中差异表达的蛋白质无 Rv1456c、Rv1457c 和 Rv1458c。

仍存在一定比例的结核分枝杆菌 SM 耐药株不是通过基因突变、药物外排系统等途径产生的,因此

有必要探索结核分枝杆菌 SM 耐药新机制。通过蛋白质组学已发现了一些蛋白在 SM 耐药株中差异表达: Sharma 等采用双向凝胶电泳联合质谱技术,发现 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SM 体外刺激结核分枝杆菌 SM 耐药株引起 6 个蛋白上调表达,分别是 DnaK (Rv0350), fabG4 (Rv0242c), DNA 结合蛋白 (Rv0054), 假设蛋白 (Rv3867), 14 kDa 蛋白 (Rv0251) 和 10 kDa 伴侣分子 (Rv3418)^[22]。采用同样方法,发现结核分枝杆菌临床分离 SM 耐药株相对 SM 敏感株上调表达 9 个蛋白 (Rv0350, Rv0440, Rv1240, Rv3075c, Rv2971, Rv3028c, Rv2145c, Rv2031c 和 Rv0569), 其中 Rv0350、Rv0440 和 Rv2971 与 SM 相互作用具有显著意义^[23]。本文运用 iTRAQ 技术也发现 Rv0350 和 Rv0440 在 SM 耐药株 01108 中 (与 SM 敏感株 01105 比较) 上调表达;但 Rv2031c, Rv1240、Rv3075c 和 Rv2971 仅在 SM 耐药株 01108 与 SM 敏感株 01105 比较中存在差异表达、并在 01108 菌株中下调表达。这种不同蛋白质组学方法发现不同差异蛋白的现象较常见^[24]。还新发现了 SM 耐药株 01108 与 SM 敏感株 01105 和 H37Rv 比较,均有差异表达且差异倍数较大的有 7 个蛋白 (Rv2466c、Rv1932、Rv0824c、Rv2785c、Rv2215、Rv3133c 和

Rv2626c)。其它研究发现 Rv2215 和 Rv0824c 为结核分枝杆菌生长必需基因, Rv1932、Rv3133c 和 Rv2466c 为结核分枝杆菌生长非必需基因^[25]; Rv2215 Rv3133c 和 Rv1932 (Tpx) 可能是结核分枝杆菌的毒力因子^[26-28]; Rv0824c 蛋白为主要的 B 细胞抗原, 是结核病人体液免疫重要免疫靶点^[29]。但这些蛋白与结核分枝杆菌 SM 耐药的关系还未见报道, 因此, 值得进一步探讨这些蛋白与结核分枝杆菌 SM 耐药的关系, 为进一步研究结核分枝杆菌 SM 耐药机制提供新靶点。

致谢 感谢中国科学院北京基因组研究所、北京华大蛋白研发中心董予升老师和李扬老师等帮助完成定量蛋白质组学中蛋白质鉴定工作。

参考文献

- [1] Global tuberculosis control: WHO report 2011, Geneva, World Health Organization, 2011, 9-10.
- [2] Honor é N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1994, 38 (2) :238-242.
- [3] Ulger M, Aslan G, Emekdaş G, Tezcan S, Serin MS. Investigation of rpsL and rrs gene region mutations in streptomycin resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2009, 43 (1) :115-120.
- [4] Cole ST, Telenti A. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *The European respiratory journal*, 1995, 20 : 701s-713s.
- [5] Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 1995, 171 (4) :954-960.
- [6] Hegde SS, Javid-Majd F, Blanchard JS. Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase [AAC (2')-Ic] from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276 (49) : 45876-45881.
- [7] Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, Ochi K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16 S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular microbiology*, 2007, 63 (4) :1096-1106.
- [8] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405 (6788) :837-846.
- [9] Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, Wang J, Li S, Li R, Bolund L, Wang J. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic acids research*, 2006, 34:W293-297.
- [10] Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, 2005, 1 (5) : 252-262.
- [11] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics*, 2004, 3 (12) :1154-1169.
- [12] Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, iCAT, and iTRAQ, using 2D Gel- or LC-MALDI -TOF/TOF. *Journal of proteome research*, 2006, 5 (3) : 651-658.
- [13] Shui W, Gilmore SA, Sheu L, Liu J, Keasling JD, Bertozzi CR. Quantitative proteomic profiling of host-pathogen interactions: the macrophage response to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of proteome research*, 2009, 8 (1) :282-289.
- [14] Ndung'u PW, Kariuki S, Ng 'ang' a Z, Revathi G. Resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients in Nairobi. *Journal of infection in developing countries*, 2012, 6 (1) :33-39.
- [15] Nhu NT, Lan NT, Phuong NT, Chau Nv, Farrar J, Caws M. Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and Mycobacterium tuberculosis genotypes. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 2012, 16 (4) :527-531.
- [16] Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, Martín-Casabona N, Montemayor M, Moure R, Orcau

- A, Salvadó M, Vicente E, González-Martín J. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2010, 65 (11) :2341-2346.
- [17] Li GL, Zhao DF, Xie T, Ju HF, Mu C, Zhao H, Wang XX. Molecular characterization of drug-resistant Beijing family isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Tianjin, China. *Biomedical and environmental sciences*, 2010, 23 (3) :188-193.
- [18] Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, da Silva PE, Zaha A. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49 (7) :2625-2630.
- [19] Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HI, Barry CE 3rd. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55 (6) :2515-2522.
- [20] Hao P, Shi-Liang Z, Ju L, Ya-Xin D, Biao H, Xu W, Min-Tao H, Shou-Gang K, Ke W. The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia microbiologica*, 2011, 56 (6) :549-553.
- [21] Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC microbiology*, 2011, 11 :35.
- [22] Sharma P, Kumar B, Singhal N, Katoch VM, Venkatesan K, Chauhan DS, Bisht D. Streptomycin induced protein expression analysis in *Mycobacterium tuberculosis* by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry. *The Indian journal of medical research*, 2010, 132:400-408.
- [23] Sharma P, Kumar B, Gupta Y, Singhal N, Katoch VM, Venkatesan K, Bisht D. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteome Science*, 2010, 18 (8) : 59.
- [24] Mehaffy C, Hess A, Prenni JE, Mathema B, Kreiswirth B, Dobos KM. Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 2010, 10 (10) :1966-1984.
- [25] Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular microbiology*, 2003, 48 (1) :77-84.
- [26] Venugopal A, Bryk R, Shi S, Rhee K, Rath P, Schnappinger D, Ehrt S, Nathan C. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* depends on lipamide dehydrogenase, a member of three multienzyme complexes. *Cell host and microbe*, 2011, 9 (1) :21-31.
- [27] Shi S, Ehrt S. Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infection and immunity*, 2006, 74 (1) :56-63.
- [28] Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 2003, 71 (3) :1134-1140.
- [29] Jackson M, Portnoi D, Catheline D, Dumail L, Rauzier J, Legrand P, Gicquel B. *Mycobacterium tuberculosis* Des protein: an immunodominant target for the humoral response of tuberculous patients. *Infection and immunity*, 1997, 65 (7) :2883-2889.

Quantitative proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

Chuanzhi Zhu¹, Yanlin Zhao², Xiangyu Huang¹, Yu Pang², Yazhen Zhao¹,
Yuhui Zhuang¹, Xiuyun He^{1*}

¹ Beijing Key Laboratory of Transplantation and Immune Regulation, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

² National Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: [Objective] To identify specific antigens related to streptomycin resistant (SM^r) *Mycobacterium tuberculosis*. [Methods] Cellular proteins were extracted from SM^r clinical isolate 01108, SM-sensitive clinical isolate 01105 and H37Rv. Differential expression proteins were identified with isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) combined with Nano LC-MS/MS technology. [Results] Approximately 194 and 146 differential expression proteins were identified in 01108 strain compared with the proteomic profiles of 01105 strain and H37Rv, respectively, and 121 proteins were identified in 01108 strain compared with the proteomic profiles of both 01105 strain and H37Rv. Identified proteins showed a pI (isoelectric point) variation between 3.74 – 12.48 and a molecular mass (M_r) range between 7.63 and 326.2 kDa. Differential expression proteins were mainly associated with metabolism (involved in intermediary metabolism, respiration, and lipid metabolism) and took part in catalysis and binding function. Seven ribosomal proteins (Rv0056, Rv0641, Rv0652, Rv0701, Rv1630, Rv2442c and Rv2785c) and seven proteins (the ratios > 1.20 or < 0.55) were commonly down-regulated in 01108 strain compared with both 01105 strain and H37Rv, i. e. the thiol peroxidase (Rv1932), acyl carrier protein dehydrogenase (Rv0824c), 30S ribosomal protein S15 (Rv2785c), acetone acid dehydrogenase E2 part (Rv2215), two-component transcriptional regulatory protein (Rv3133c) and Hypothetical protein (Rv2466c and Rv2626c). [Conclusion] Differential expression proteins were found in SM^r strain compared with both SM-sensitive strain and H37Rv. Further studies are needed to assess the role of these differential expression proteins in SM resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, streptomycin, quantitative proteomics, iTRAQ

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Major Infectious Diseases Key Project (2008ZX10003-009)

* Corresponding author. Tel: +86-10-66775520 E-mail: xwhe@sohu.com

Received: 19 September 2012 / Revised: 29 November 2012