

云南省家、野鼠两型鼠疫菌比较蛋白质组的初步研究

王鹏 赵飞 郭英 肖迪 宋志忠 张建中

【关键词】鼠疫菌; 蛋白质组

Preliminary study on proteome of *Yersinia pestis* isolated from Yunnan, China WANG Peng^{1, 2}, ZHAO Fei², GUO Ying¹, XIAO Di², SONG Zhi-zhong¹, ZHANG Jian-zhong². 1 Provincial Key Laboratory for Plague Control and Prevention, Yunnan Institute for Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China; 2 Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: SONG Zhi-zhong, Email: 13808766541@126.com; ZHANG Jian-zhong, Email: zhangjianzhong@icdc.cn

This work was supported by grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z4A7) and Yunnan Science and Technology Research Program (No. 2007CA010).

【Key words】*Yersinia pestis*; Proteome

云南省存在家、野鼠两型鼠疫源地。已有研究证实, 两型鼠疫菌具有不同的生物学特性^[1], 对人群的危险度也不尽相同。进一步探究二者间的差异, 为制定合理的防治策略提供更多依据。蛋白质组分析是一种以双向电泳和飞行质谱鉴定为核心技术的方法, 具有高通量、重复性好以及较敏感等优点。在鼠疫菌的蛋白质组分析中, 有针对鼠疫菌Ⅲ型分泌系统低钙反应抗原^[2,3]、鼠疫菌毒力相关蛋白^[4,5]、外膜蛋白和内膜蛋白^[6,7], 以及针对不同生长条件下蛋白质组差异表达的分析^[8]。本研究旨在通过对云南家、野鼠两型鼠疫菌的比较蛋白质组分析, 寻找二者之间的差异蛋白及探讨其意义。

1. 材料与方法:

(1) 鼠疫菌株: 共选取 6 株菌进行蛋白质组比对。家鼠鼠疫菌株 3 株, 其中 2 株 (No. 1816、1837) 分离自德宏, 1 株 (No. 2302) 分离自文山; 野鼠鼠疫菌 2 株, 分别分离自丽江 (No. 485) 和大理 (No. 1412); 以及鼠疫疫苗株 EV76。菌株保存于云南省地方病防治所。

(2) 蛋白样品制备: ①鼠疫菌经 37 °C 培养 48 h, 用生理盐水洗取菌苔; ②加入冷丙酮溶液 (含 2 g/L 的 DTT、20 g/L 的 TCA), -20 °C 过夜; ③4 °C, 4300 × g 离心 10 min 后, 将沉淀悬于含 2 g/L DTT 的丙酮中, -20 °C 放置 2 h, 离心弃上清;

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.026

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2006AA02Z4A7); 云南省科技攻关项目 (2007CA010)

作者单位: 671000 大理, 云南省地方病防治所云南省鼠疫防控技术重点实验室 (王鹏、郭英、宋志忠); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室 (王鹏、赵飞、肖迪、张建中)

通信作者: 宋志忠, Email: 13808766541@126.com; 张建中, Email: zhangjianzhong@icdc.cn

④沉淀置于 -80 °C 冰箱中预冻后真空抽干; ⑤将蛋白干粉溶于裂解液 (含尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, CHAPS 4%, PMSF 10 mmol/L) 中, 4 °C 放置约 4 h; ⑥超声助溶, 至溶液澄清透明; ⑦ 4 °C, 17 000 × g 离心 10 min, 弃沉淀后, 上清进行蛋白定量。

(3) 双向电泳: 使用 24 cm 的非线性干胶条 (pH 值范围在 3 ~ 10), 每块胶的蛋白上样量为 800 μg。水化液成分为 6 mol/L 的尿素, 2 mol/L 的硫脲, 溴酚蓝少量。用前加 1% IPG Buffer、2% 的 DTT。等电聚焦程序: 表面温度为 20 °C, 胶条电流 50 μA, 30 V (step-n-hold) 5 h, 60 V (step-n-hold) 5 h, 100 V (step-n-hold) 1 h, 300 V (step-n-hold) 1 h, 600 V (step-n-hold) 1 h, 1000 V (step-n-hold) 1 h, 8000 V (gradient) 1 h, 8000 V (step-n-hold) 9 h, 总共聚焦约 77 000 Vh; 胶条在含 10 g/L DTT 和 48 g/L 碘乙酰胺中进行两步平衡后, 转至 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上, 2.5 W/gel 电泳 30 min 后, 16 W/gel 电泳至溴酚蓝线距胶下缘约 5 mm 处。胶用考马斯亮蓝染色, 扫描采集图像后将胶放于 4 °C 保存, 以备切点鉴定。

(4) 蛋白点消化和鉴定: 采用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析图像, 找出差异点; 切取点后, 进行胰酶消化, 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析; 使用 GPS Explorer Workstation 软件搜索 NCBI nr 数据库。

2. 结果:

(1) 双向电泳分析: 经双向电泳得到 6 株菌株蛋白质组电泳图谱 (图 1)。结果显示, 蛋白的分辨性较好, 每株菌的图谱中能清晰分辨的点都在 500 个以上, 比对显示, 各蛋白质组图谱之间有较高相似性。

(2) 菌株间差异蛋白分析: No. 1816 和 1837 菌株较其余 4 株 (包括疫苗株 EV76) 多了 2 个明显的点, 即在 No. 1816 株标记为 A1 和 A3, 在 No. 1837 株标记为 A4 和 A6。这 2 株菌另有一个蛋白点较其余 4 株菌表达明显高, 分别标记为 A2 和 A5 (图 2)。

(3) 差异蛋白鉴定: 对 6 个差异点进行了 MALDI-TOF 质谱分析, 应用软件 Mascot, 以细菌为种属范围对各点的肽质量搜索 Swissprot 和 TrEMBL 数据库, 差异蛋白共鉴定出两种蛋白, 即图 2 中点 A1、A2、A4 及 A5 为甘油激酶 (glycerol kinase); 点 A3 与 A6 为硫酸盐转运蛋白 (sulfate transporter subunit)。

3. 讨论: 德宏州是云南省最为典型的家鼠鼠疫源地之一。自 1982 年云南省鼠疫复燃以来, 截至 2004 年, 在该省 13 个鼠疫流行地州中, 只有德宏州每年都有疫情^[9], 这是否与其菌株的某些特性相关, 一直受到关注。

德宏分离株属东方型菌株, 其甘油醇解为阴性^[10]。已有

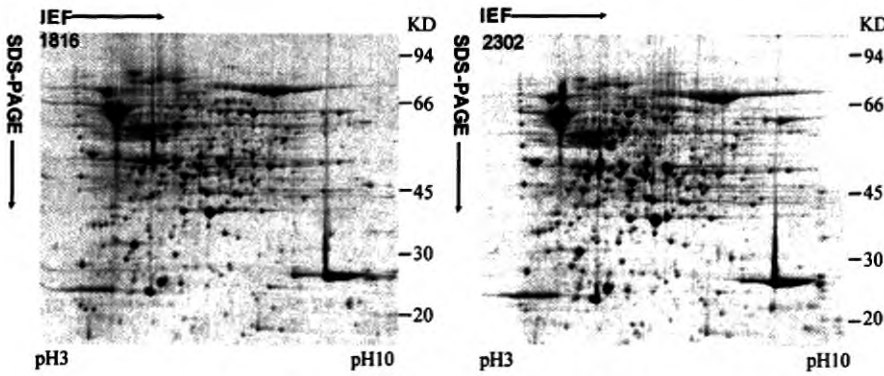


图1 云南家、野鼠鼠疫菌株的双向电泳分析

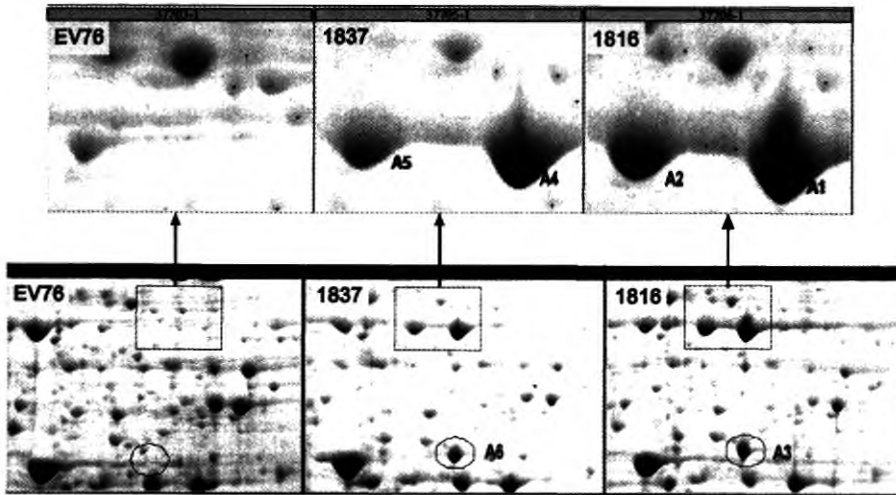


图2 云南省德宏地区家鼠鼠疫分离株(No. 1816和No. 1837)与疫苗株EV76的差异点

研究证实,甘油-3-磷酸脱氢酶功能的丧失,造成东方型菌株甘油酵解的阴性表型^[11],因此在东方型菌株中甘油不能作为其能量代谢的底物,甘油主要用于合成代谢。细菌内甘油的利用主要由甘油激酶介导^[12]。在鼠疫东方型菌株内,甘油激酶是其磷脂代谢中的一种关键酶,甘油激酶磷酸化甘油专一地生成α-磷酸甘油,该反应过程不可逆,且需要Mg²⁺的参与^[13]。磷酸甘油与乙酰辅酶A(Acyl-CoA)结合生成磷脂酸,进一步生成细菌细胞膜的主要成分甘油三酯(磷脂)。德宏分离株中高表达的甘油激酶,说明其磷脂代谢较为活跃,使其能有效利用甘油生成细胞膜。动物体内富含甘油,德宏株对甘油的高利用率可能与其在自然界长期存在相关。

硫酸盐转运蛋白(CysA)是三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运体中的ATP结合蛋白,是细菌利用硫酸盐必需的一种蛋白,分离自德宏州的2株鼠疫菌中较EV76株及其他分离株高表达该ATP结合蛋白,提示这2株菌株对硫酸盐的利用较为活跃,这与其生存应有重要意义,推测可能是德宏分离株能在自然界中长期存在并流行的又一成因。

参 考 文 献

[1] Wang P, Guo Y, Shi LY, et al. The contrast research of biochemical characters and nutrition requirement between rat plague strains and wild rodent plague strains in Yunnan. Chin J Endemiol, 2003, 22(3):217-220. (in Chinese)

王鹏,郭英,石丽媛,等. 云南省家、野两型鼠疫菌生化特性及营养需求的比较研究. 中国地方病学杂志, 2003, 22(3):217-220.

[2] Perry RD, Harmon PA, Bowmer WS, et al. A low-Ca²⁺ response operon encodes the V antigen of *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1986, 54:428-434.

[3] Price SB, Straley SC. IcrH, a gene necessary for virulence of *Yersinia pestis* and for the normal response of *Y. pestis* to ATP and calcium. Infect Immun, 1989, 57: 1491-1498.

[4] Straley SC, Brubaker RR. Localization in *Yersinia pestis* of peptides associated with virulence. Infect Immun, 1982, 36: 129-135.

[5] Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, et al. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. J Bacteriol, 2005, 187:8172-8180.

[6] Pieper R, Huang ST, Clark DJ, et al. Integral and peripheral association of proteins and protein complexes with *Yersinia pestis* inner and outer membranes. Proteome Sci, 2009, 7:5.

[7] Pieper R, Huang ST, Robinson JM, et al. Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a type VI secretion system in *Yersinia pestis*. Microbiology, 2009, 155:498-512.

[8] Pieper R, Huang ST, Clark DJ, et al. Characterizing the dynamic nature of the *Yersinia pestis* periplasmic proteome in response to nutrient exhaustion and temperature change. Proteomics, 2008, 8:1442-1458.

[9] Wu AG. An epidemiological analysis of 112 plague patients in Yunnan. Bull Endemic Dis, 1994, 9(1):52-55. (in Chinese) 吴爱国. 云南112例鼠疫患者流行病学分析. 地方病通报, 1994, 9(1):52-55.

[10] Zhou DS, Tong ZZ, Song YJ, et al. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar microtus. J Bacteriol, 2004, 186(15):5147-5152.

[11] Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). J Bacteriol, 2002, 184: 1019-1027.

[12] Wehtje C, Beijer L, Nilsson RP, et al. Mutations in the glycerol kinase gene restore the ability of a ptsGHI mutant of *Bacillus subtilis* to grow on glycerol. Microbiology, 1995, 141 (Pt5): 1193-1198.

[13] Hayashi SI, Lin EC. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. J Biol Chem, 1967, 242: 1030-1035.

(收稿日期:2011-05-04)

(本文编辑:张林东)