

网络出版时间:2019-01-14 09:36 DOI10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.07.005
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190114.0935.010.html

沙门菌标准株及其环丙沙星耐药株 蛋白表达差异分析

张瑞良¹,徐 军¹,王 瑞¹,王文静¹,王 磊¹,
赵 霞¹,易 刚²,李 琳¹

(1 安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036;2 合肥野生动物园,安徽 合肥 230031)

[摘 要] 【目的】比较鼠伤寒沙门菌标准株及其环丙沙星体外诱导耐药株菌的蛋白表达图谱差异,分析这些蛋白在鼠伤寒沙门菌诱导耐药过程中的作用,为沙门菌耐药机理的研究提供参考。【方法】将沙门菌标准株和环丙沙星耐药株在 LB 培养基中培养至对数期,然后超声破碎细菌制备蛋白样品,进行二维电泳,电泳胶经扫描分析后选取差异表达蛋白点进行质谱鉴定。【结果】沙门菌环丙沙星耐药株与标准株有 25 个差异表达蛋白,其中磷酸化孔蛋白 PhoE、二氢硫辛酰胺脱氢酶组件蛋白、ATP 合成酶、细胞侵袭蛋白 SipD 的 A 亚基、锰过氧化物酶、二氢硫辛酰胺转琥珀酰酶、果糖二磷酸醛缩酶、假定蛋白 AF355_20900 等 8 个蛋白表达量下调,磷酸乙酰基转移酶、天冬氨酸转氨酶、RND 家族外排泵的膜融合蛋白、鞭毛马达开关 FliM、三磷酸甘油醛脱氢酶、OmpA 外膜蛋白、蛋白质链伸长因子 EF-Ts、丙二醇利用蛋白 PduB、NAD(P)H 硝基还原酶、假定硫醇-烷基过氧化氢还原酶、50S 核糖体亚基 L4、肽 ABC 转运体结合蛋白、假定的胞质蛋白、锰超氧化物歧化酶、30S 核糖体 S4 亚基、TolC 外膜蛋白、短链脱氢酶等 17 个蛋白表达量上调。这 25 个差异蛋白中,有 1 个(1 号)与抗药性无关,有 2 个(8 和 21 号)为未知功能蛋白,其余 22 个是与细菌耐药性相关的蛋白。这 22 个蛋白可分为 4 类,其中耐药相关蛋白 5 个、毒力相关蛋白 2 个、蛋白质合成相关蛋白 3 个、代谢相关蛋白 12 个;其亚细胞定位为:细胞质中的蛋白 15 个、外膜蛋白 3 个、细胞质内膜蛋白 2 个、周质蛋白和细胞外蛋白各 1 个。【结论】与沙门菌标准株相比,耐环丙沙星沙门菌有 25 个差异表达蛋白(8 个表达下调,17 个表达上调),其中 22 个与耐药性相关,分属 4 个功能类别,定位于 5 个亚细胞组分。

[关键词] 鼠伤寒沙门菌;耐药性;环丙沙星;体外诱导;蛋白表达图谱

[中图分类号] S852.61

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)07-0032-08

Difference in protein expression between ciprofloxacin resistant strain and standard strain of *Salmonella*

ZHANG Ruiliang¹, XU Jun¹, WANG Rui¹, WANG Wenjing¹, WANG Lei¹,
ZHAO Xia¹, YI Gang², LI Lin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China;

2 Hefei Wildlife Park, Hefei, Anhui 230031, China)

Abstract: 【Objective】This study compared bacterial protein expression profiles of *Salmonella typhimurium* standard strain and ciprofloxacin strain in vitro and analyzed the role of proteins in induction of drug resistance to provide reference for understanding drug resistance mechanism of *Salmonella*. 【Method】*Salmonella* standard strains and ciprofloxacin resistant strains were cultured in logarithmic phase in LB

[收稿日期] 2018-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31772802);安徽高校自然科学重点研究项目(KJ2017A132);安徽省优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016041)

[作者简介] 张瑞良(1992—),男,安徽淮北人,在读硕士,主要从事细菌耐药性研究。E-mail:1506480393@qq.com

[通信作者] 李 琳(1978—),女,安徽界首人,副教授,硕士生导师,主要从事细菌耐药性研究。E-mail:lilinah@126.com

medium. Protein samples were prepared by ultrasonic disruption of bacteria, and two-dimensional electrophoresis was carried out before the protein spots in electrophoretic gel were selected for mass spectrometry identification. 【Result】 There were 25 differentially expressed proteins between *Salmonella* ciprofloxacin resistant strains and standard strains, among which phosphorylated porin PhoE, dihydrolipoamide dehydrogenase component protein, ATP synthase, cell invasion protein SipD, manganese catalase, dihydrolipoamide amide succinylase, fructose diphosphate aldolase, and putative protein AF355_20900 had down-regulated expression, while phosphor acetyltransferase, aspartate aminotransferase, RND membrane fusion protein of family efflux pump, flagellar motor switch FlhM, glyceraldehyde triphosphate dehydrogenase, OmpA outer membrane protein, protein chain elongation factor EF-Ts, propylene glycol utilization protein PduB, NAD(P)H nitroreductase, putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase, 50S ribosomal subunit protein L4, peptide ABC transporter binding protein, putative cytoplasmic protein, manganese superoxide dismutase, 30S ribosomal S4 subunit, TolC outer membrane protein, short-chain dehydrogenase had up-regulated expression. Of the 25 differential proteins, 1 (No. 1) was not related to drug resistance, 2 (8 and 21) were unknown functional proteins, and the remaining 22 were bacterial resistance-related proteins. These 22 proteins can be divided into 4 categories, including 5 resistance-related proteins, 2 virulence-related proteins, 3 protein-related proteins, and 12 metabolic related proteins. The subcellular localization showed there were 15 proteins in the cytoplasm, 3 outer membrane proteins, 2 cytoplasmic inner membrane proteins, 1 periplasmic protein, and 1 extracellular protein. 【Conclusion】 There were 25 differentially expressed proteins between *Salmonella* ciprofloxacin strain (8 down-regulated and 17 up-regulated) and standard strain, 22 of which were related to drug resistance, belonging to 4 functional categories and located in 5 subcellular fractions.

Key words: *Salmonella*; drug resistance; ciprofloxacin; induction *in vitro*; protein expression profile

沙门菌是重要的食源性人兽共患病原菌,可引起食物中毒和败血症等,对人的生命安全和畜牧业发展有很大危害^[1]。氟喹诺酮类药物(Fluoroquinolones, FQs)是治疗沙门菌病的常用药物,但由于FQs的大量使用甚至滥用导致沙门菌耐药性迅速上升^[2]。因此,深入探讨沙门菌的耐药机理成为解决其耐药性问题的关键。沙门菌主要通过药物作用靶位的基因突变、质粒介导的基因水平传播、增强主动外排功能等方式产生耐药性^[3-5]。

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,大规模、系统地研究蛋白质的特征及结构,包括蛋白质的表达水平、翻译后修饰、相互作用等^[6]。目前,质谱同各种蛋白质分离技术和生物信息学工具的联合使用,已成为蛋白质组学研究的主要方法^[7]。二维电泳作为蛋白质组学的核心技术,是唯一能同时将千种蛋白质分离和展示的技术,因此,被广泛应用于生物学研究中^[8],尤其是对微生物特定表型的研究。该方法可以更好地分析不同微生物中蛋白表达量的差异,找出与特定表型相关的蛋白组分。本研究以鼠伤寒沙门菌为研究对象,利用二维电泳结合质谱鉴定技术对诱导耐药沙门菌的蛋白质组学进行研

究,通过比较耐药株和标准株的蛋白质表达图谱,筛选出鼠伤寒沙门菌的耐药相关蛋白,鉴定并探讨其功能,为深入研究沙门菌的耐药机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 鼠伤寒沙门菌 ATCC 13311(标准株),由中国农业大学动物医学院兽医毒理学与毒理学实验室惠赠;鼠伤寒沙门菌环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)体外耐药株,由兽医毒理学与毒理学课题组采用药物浓度递增法对标准株进行诱导所得,其对CIP的耐药值为32 mg/L^[9]。

1.1.2 主要试剂和仪器 CIP标准品(CIP含量为84.9%),购自中国食品药品检定研究院;IPG预制胶条(7 cm pH 5~8、7 cm pH 3~10、17 cm pH 3~10)、载体两性电解质(Bio-Lyte)、矿物油、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、样品净化试剂盒(ReadyPrep 2-D Cleanup Kit),购自Bio-Rad公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA),购自Sigma公司;溴酚蓝、考马斯亮蓝 G250,购自上海麦克林生化科技有限公司;Bradford蛋白检测试剂

盒、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(Aprotinin)、亮抑酶肽(Leupeptin),购自北京天根生化科技有限公司;尿素、30%聚丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)、低熔点的琼脂糖,购自上海生工生物工程有限公司。

LRH-250 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;JY92-II 超声波细胞破碎机,宁波新芝科器研究所;TS-100 脱色摇床,北京市新技术应用研究所;医用低温保存箱 DW-25W198,海尔特种电器有限公司;培清 JS-680D 全自动凝胶成像系统分析仪,上海培清科技有限公司;等电聚焦仪、垂直板电泳仪、扫描仪,Bio-Rad 公司;冷冻高速离心机 Allegra 64R, BECKMAN COULTER。

1.1.3 溶液配制 LB 液体培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH 7.4。

水化液:尿素 8 mol/L,DTT 65 mmol/L,CHAPS 40 g/L,Bio-Lyte 2 g/L,溴酚蓝 0.01 g/L。

胶条平衡液 I:尿素 8 mol/L,SDS 20 g/L,Tris-HCl (pH 8.8)0.375 mol/L,体积分数 20%甘油和 DTT 20 g/L。

胶条平衡液 II:尿素 8 mol/L,SDS 20 g/L,Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 mol/L,体积分数 20%甘油和碘乙酰胺 25 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养与总蛋白的制备 分别挑取鼠伤寒沙门菌标准株和 CIP 诱导耐药株的单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养过夜,按照体积比 1:100 将 1.5 mL 菌液接种于 150 mL LB 液体培养基,37 °C 培养至对数生长期;4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,收集菌体沉淀,PBS 缓冲液重悬、离心、洗 3 次,以更好除去菌体内杂质。

将收集到的菌体沉淀,悬浮于 3 mL TE Buffer,加入蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF,2 mg/L 抑肽酶,5 mg/L 亮抑酶肽),超声破碎(200 W,工作 3 s 停 5 s,超声 8 min)。4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,收集上清,用 PeadyPrep 2-D Cleanup Kit 进行纯化,每管沉淀加入 200 μ L 水化上样缓冲液,室温放置 30 min,每隔 10 min 用涡旋振荡器振荡混匀。当蛋白充分溶解后用冷冻高速离心机 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min 去除不溶杂质,上清即为处理好的蛋白质样品,-80 °C 贮存。采用 Bradford 蛋白检测试剂盒测定样品中的蛋白质浓度。

1.2.2 二维电泳 pH 范围的确定 利用 7 cm pH

5~8 和 7 cm pH 3~10 的 IPG 预制胶条对鼠伤寒沙门菌标准株的菌体蛋白进行二维电泳,根据蛋白的分离情况,确定二维电泳 pH 范围。

1.2.3 沙门菌标准株和 CIP 耐药株的二维电泳 分别取沙门菌标准株和 CIP 耐药株冻存的蛋白样品各 1.5 mg,与水化上样缓冲液混合,终体积为 400 μ L,涡旋混合均匀,加入 IPG,聚焦盘中槽的边缘从左向右线性匀速加入样品,槽两端各 1 cm 左右不加样,保证样品液的连贯性,防止产生气泡。将固相化 pH 梯度胶条(17 cm,pH 3~10)置于聚焦盘相应的聚焦槽内,放入等电聚焦电泳仪中,按照以下程序完成等电聚焦:50 V、20 °C、主动水化 14 h;250 V 线性 0.5 h;1 000 V 快速 1 h;10 000 V 线性 5 h;10 000 V 快速 60 000 V 时聚焦;500 V 维持。将等电聚焦完的胶条先后置于平衡缓冲液 I 和平衡缓冲液 II 中分别轻微振荡 15 min。将平衡后的胶条置于预先灌制 10% SDS-PAGE 胶上,加入低熔点琼脂糖溶液,使其与 SDS-PAGE 胶紧密接触,待其完全凝固后在 BIO-RAD 电泳仪中电泳(80 V 电泳 15 min,改变电压至 150 V,直到溴酚蓝标志线接近凝胶底部时电泳结束)。电泳后的胶用固定液(体积分数 40%乙醇和体积分数 20%乙酸)固定 30 min,加入考马斯亮蓝染液染色过夜,用纯水脱色至无背景颜色。每种细菌蛋白样品均平行进行 18 次。

1.2.4 图像分析和质谱鉴定 用 Bio-Rad 公司扫描仪对脱色后凝胶扫描,用 PDQuest 8.0 二维电泳图像处理软件分析获取蛋白质点的位置坐标和表达量等信息。以标准株作为对照,分析 CIP 诱导耐药株蛋白表达图谱,统计有或无差异点以及蛋白表达量差异在 3 倍及以上的蛋白点,采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。

采下的蛋白点送至华大公司做胶内酶解和质谱分析,样品经胰酶酶解,并用 MALDI-TOF/TOF-MS 进行质谱鉴定。采用正离子模式和自动获取数据模式进行数据采集,将一级和二级质谱数据整合,使用 GPS 3.6(Applied Biosystems)和 Mascot 2.3(Matrix Science)软件对质谱数据进行分析和蛋白鉴定,并在 NCBI 数据库中检索,从而得到蛋白质鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 二维电泳 pH 的确定

从图 1 可以看出,在 pH 5~8 的 IPG 预制胶上,在 pH 小于 5 时鼠伤寒沙门菌标准株菌体蛋白

成条带状,说明未被完全分离;而在 pH 3~10 的 IPG 预制胶上所有蛋白均被很好地分离开来。因

此,后续试验选用 7 cm pH 3~10 的 IPG 预制胶条进行二维电泳。

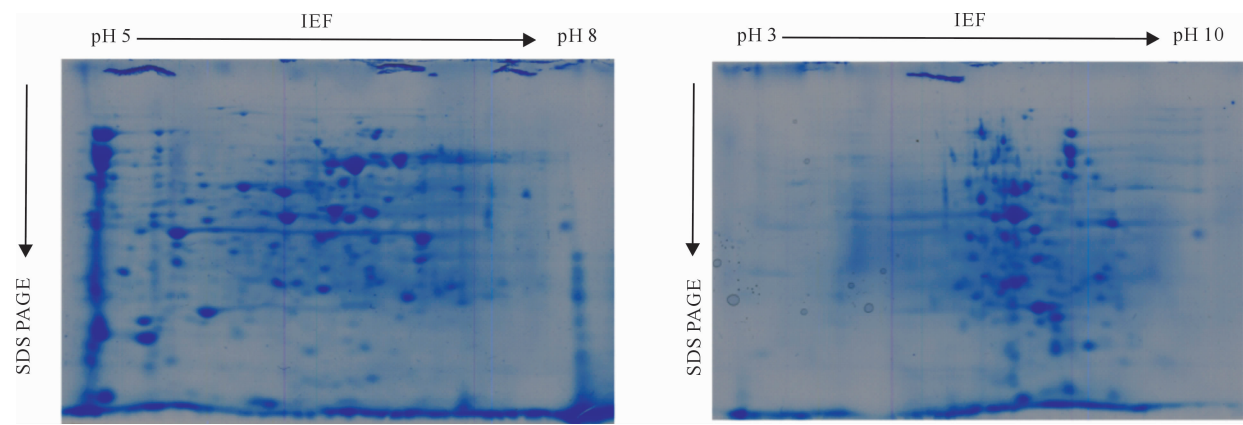
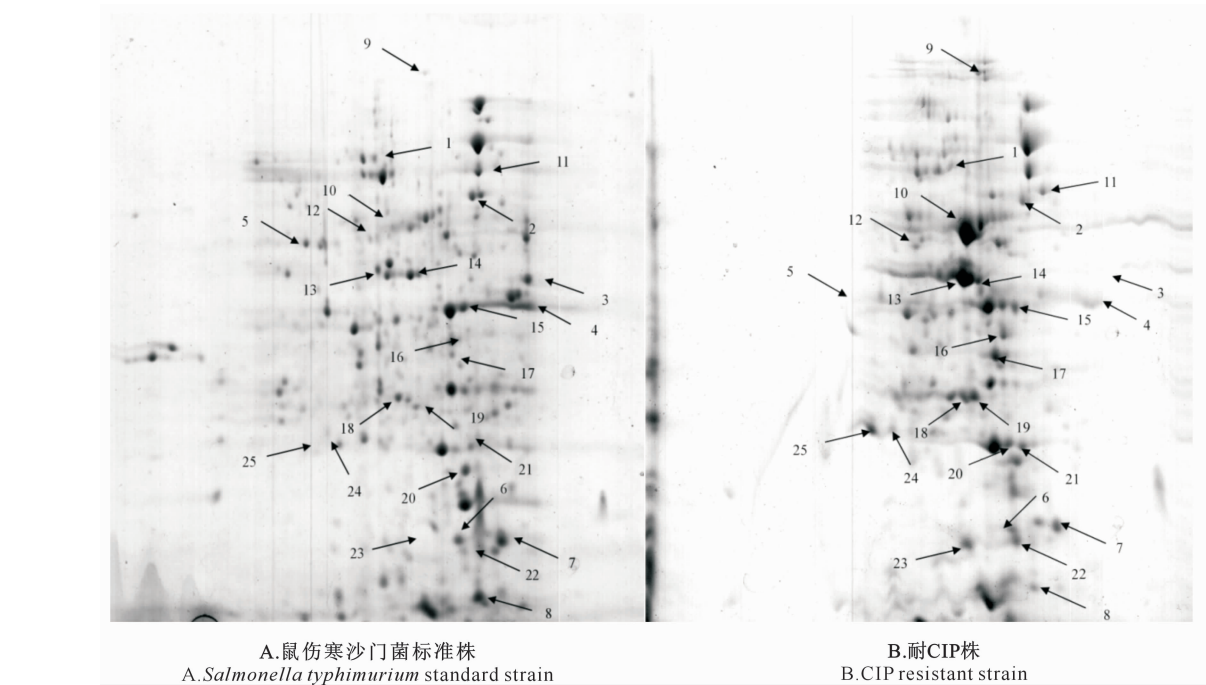


图 1 鼠伤寒沙门菌标准株菌体蛋白在 7 cm pH 5~8(A)和 7 cm pH 3~10(B)IPG 预制胶上的二维电泳
Fig. 1 2-D electrophoresis of *Salmonella typhimurium* standard strain protein on
7 cm pH 5~8 (A) and 7 cm pH 3~10 (B) IPG

2.2 鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株蛋白的二维电泳图谱分析与质谱鉴定

从各自 18 次二维电泳试验结果中,选取 3 张试验效果最好的图谱进行分析。3 张鼠伤寒沙门菌标准株菌体蛋白图谱的匹配度为 89.5%,3 张耐 CIP 株菌体蛋白图谱的匹配度为 87.4%,表明该二维电泳分析具有良好的重复性。采用 PDQuest 8.0 软

件对鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株的蛋白质点位置坐标和表达量进行分析,检测到约 400 个蛋白质点。按照表达量差异在 3 倍以上的进行校准,耐 CIP 株与标准株相比存在 25 个表达差异的蛋白点,其中 17 个上调,8 个下调(图 2)。差异蛋白点酶解液经 MALDI-TOF 质谱分析,用软件搜索 NCBI 数据库,鉴定结果如表 1 所示。



箭头所示 1~8 号表示表达量下调的蛋白,9~25 号表示表达量上调的蛋白
No. 1-8 are down-regulated proteins, and No. 9-25 are up-regulated proteins

图 2 鼠伤寒沙门菌标准株(A)和耐 CIP 株(B)菌体蛋白的二维电泳
Fig. 2 2-DE gel map of *Salmonella typhimurium* standard strain (A) and CIP resistant strain (B)

表 1 鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株表达差异蛋白点的质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differentially expressed proteins in CIP resistant and standard strains by mass

蛋白编号 Protein NO.	蛋白 ID Protein ID	分子质量/u Mr	独特肽段数 Unique peptide number	等电点 pI	蛋白名称 Protein name
1	OFB13528.1	38 319.23	7	4.35	磷酸化孔蛋白 PhoE Phosphoporin PhoE
2	ETC10995.1	48 472.31	4	6.07	二氢硫辛酰胺脱氢酶组件蛋白 Dihydrolipoamide dehydrogenase partial
3	CQF20229.1	51 326.97	4	4.63	ATP 合成酶 ATP synthase subunit beta
4	2YM9_A	37 427.65	3	4.88	细胞侵袭蛋白 SipD 的 A 亚基 Chain A,1 cell invasion protein SipD
5	PJK59187.1	31 913.76	10	4.35	锰过氧化氢酶 Mn-containing catalase
6	APF13037.1	43 833.95	2	5.39	二氢硫辛酰胺转琥珀酰酶 Dihydrolipoamide succinyltransferase
7	ETC07775.1	39 373.75	2	6.01	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase
8	KYD97569.1	41 197.70	2	4.44	假定蛋白 AF355_20900 Hypothetical protein AF355_20900
9	ETC06772.1	77 558.19	5	5.06	磷酸乙酰基转移酶 Phosphate acetyltransferase
10	AAL19932.1	43 779.18	3	5.31	天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase
11	AIE04419.1	42 280.27	19	8.82	RND 家族外排泵的膜融合蛋白 Membrane fusion protein of RND family multidrug efflux pump
12	KPF18589.1	37 890.86	4	5.66	鞭毛马达开关 FliM Flagellar motor switch protein FliM
13	ADX16991.1	36 158.52	2	6.52	三磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
14	AKD07722.1	38 537.24	3	5.21	OmpA 外膜蛋白 Outer membrane protein A
15	AAL19181.1	30 452.76	18	4.86	蛋白质链伸长因子 EF-Ts Protein chain elongation factor EF-Ts
16	ETC08003.1	28 183.53	9	5.00	丙二醇利用蛋白 PduB Propanediol utilization protein PduB
17	OPI17169.1	24 013.11	4	5.35	NAD(P)H 硝基还原酶 NAD(P)H nitroreductase
18	AAL19356.1	22 417.2	6	5.10	假定硫醇-烷基过氧化氢还原酶 Putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase
19	AAL22302.1	22 072.86	4	10.45	50S 核糖体亚基 L4 50S ribosomal subunit protein L4
20	EKT11413.1	60 408.41	2	6.80	肽 ABC 转运体结合蛋白 Peptide ABC transporter substrate-binding pro- tein
21	AAL19389.1	19 010.02	5	5.43	假定的胞质蛋白 Putative cytoplasmic protein
22	ADX19830.1	23 568.9	5	6.73	锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD) manganese superoxide dismutase
23	AKD10083.1	17 709.46	2	10.42	30S 核糖体 S4 亚基 30S ribosomal protein S4
24	CQE04930.1	53 320.9	2	5.14	TolC 外膜蛋白 Outer membrane protein TolC
25	AIL21079.1	28 022.41	3	4.90	短链脱氢酶 Short-chain dehydrogenase

注:蛋白编号同图 2。至少有 2 条或 2 条以上的独特肽段覆盖才能鉴定为相应的蛋白。

Note:Protein number is the same as Figure 2. Two or more unique peptide fragments are needed to be identified as corresponding proteins.

2.3 鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株差异蛋白功能分类及其亚细胞定位

鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株 25 个差异蛋白中,有 1 个(1 号)与抗药性无关,有 2 个(8 和 21 号)为未知功能蛋白,其余 22 个均与细菌耐药性相关。22 个与细菌耐药性相关的差异表达蛋白功能

分类及亚细胞定位结果如表 2 所示。由表 2 可知,这 22 个蛋白可分为 4 类,其中耐药相关蛋白有 5 个、毒力相关蛋白类有 2 个、蛋白质合成相关蛋白有 3 个、代谢相关蛋白有 12 个;其亚细胞定位为:细胞质中的蛋白 15 个、外膜蛋白 3 个、细胞质内膜蛋白 2 个、周质蛋白和细胞外蛋白各 1 个。

表 2 鼠伤寒沙门菌标准株和耐 CIP 株差异表达蛋白的功能分类及亚细胞定位

Table 2 Functional classification and subcellular localization of differentially expressed proteins between *Salmonella typhimurium* standard strain and CIP resistant strain

蛋白名称 Protein name	功能分类 Functional classification	亚细胞定位 Subcellular location
二氢硫辛酰胺脱氢酶组件蛋白 Dihydrolipoamide dehydrogenase,partial	代谢相关蛋白 Metabolic related protein	细胞质 Cytoplasmic
ATP 合成酶 ATP synthase subunit beta		细胞质 Cytoplasmic
锰过氧化氢酶 Mn-containing catalase		细胞质 Cytoplasmic
二氢硫辛酰胺转琥珀酰酶 Dihydrolipoamide succinyltransferase		细胞质 Cytoplasmic
果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase		细胞质 Cytoplasmic
磷酸乙酰基转移酶 Phosphate acetyltransferase		细胞质 Cytoplasmic
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase		细胞质 Cytoplasmic
三磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		细胞质 Cytoplasmic
丙二醇利用蛋白 PduB Propanediol utilization protein PduB		细胞质 Cytoplasmic
NAD(P)H 硝基还原酶 NAD(P)H nitroreductase		细胞质 Cytoplasmic
假定硫醇-烷基过氧化氢还原酶 Putative thiol-alkyl hydroperoxide reductase		外膜 Outer membrane
短链脱氢酶 Short-chain dehydrogenase		细胞质 Cytoplasmic
细胞侵袭蛋白 SipD 的 A 亚基 Chain A,1 Cell invasion protein SipD	毒力相关蛋白 Virulence related protein	胞外 Extracellular
锰超氧化物歧化酶 (Mn-SOD) Manganese superoxide dismutas		细胞质 Cytoplasmic
RND 家族外排泵的膜融合蛋白 Membrane fusion protein of RND family multidrug efflux pump		细胞质内膜 Cytoplasmic membrane
鞭毛马达开关 FliM Flagellar motor switch protein FliM	耐药相关蛋白 Resistance related proteins	细胞质内膜 Cytoplasmic membrane
OmpA 外膜蛋白 Outer membrane protein A		外膜 Outer membrane
肽 ABC 转运体结合蛋白 Peptide ABC transporter substrate-binding protein		周质 Periplasmic
TolC 外膜蛋白 Outer membrane protein TolC		外膜 Outer membrane
蛋白质链伸长因子 EF-Ts Protein chain elongation factor EF-Ts		细胞质 Cytoplasmic
50S 核糖体亚基 L4 50S ribosomal subunit protein L4	蛋白质合成的蛋白 Protein synthesis protein	细胞质 Cytoplasmic
30S 核糖体 S4 亚基 30S ribosomal protein S4		细胞质 Cytoplasmic

3 讨 论

本研究通过二维电泳技术筛选鼠伤寒沙门菌耐 CIP 株与标准株之间的差异表达蛋白质,得到 25 个差异表达蛋白点,其中 8 个下调、17 个上调。经质谱分析对 25 个差异蛋白点进行了蛋白种类鉴定,发现了 5 个耐药相关蛋白、2 个毒力相关蛋白、3 个蛋白质合成相关蛋白和 12 个代谢相关蛋白。

3.1 耐药相关蛋白

本研究发现的 5 个耐药相关蛋白分别为 RND 家族外排泵的膜融合蛋白、肽 ABC 转运体结合蛋白、外膜蛋白 (TolC 、OmpA) 和鞭毛马达开关

FliM,其中 RND 家族外排泵的膜融合蛋白、肽 ABC 转运体结合蛋白和外膜蛋白 TolC 与以往的报道相符,如 Venter 等^[10]研究发现,在革兰氏阴性菌中,RND 家族外排泵的膜融合蛋白过表达是细菌形成耐药性的重要原因之一;RND 家族外排泵的膜融合蛋白作为细菌外排泵结构的重要组成部分,其缺失会使细菌耐药性减弱^[11];肽 ABC 转运体结合蛋白作为 ABC 转运系统的组成部分,在耐药方面发挥重要作用^[12];TolC 蛋白在大肠杆菌中与 AcrAB 组成了外排泵系统并参与药物运输。研究表明,缺失 *TolC* 基因会使细菌的 MIC 降低^[13];此外 Ricci 等^[14]研究表明,当鼠伤寒沙门菌缺失了 *TolC* 基因

时,筛选不到突变株。

这 5 个蛋白中,鞭毛马达开关 FliM 蛋白和 OmpA 蛋白在沙门菌中是新发现的差异表达蛋白。鞭毛马达开关 FliM 蛋白与 FliG、FliN 蛋白构成鞭毛马达的转子,可以控制鞭毛的旋转方向,改变菌体运动状态,从而躲避不利因素^[15]。沈日敏等^[16]研究发现,*fliM* 基因缺失的茎瘤固氮根瘤菌丧失鞭毛和趋化能力。OmpA 蛋白是革兰氏阴性细菌中比较丰富的孔蛋白,Smani 等^[17]研究发现,在鲍曼不动杆菌中缺失 *OmpA* 基因会导致其对氯霉素、氨曲南和萘啶酸的 MIC 降低,说明 OmpA 外膜蛋白在细菌耐药性方面具有重要作用。

此外本试验还发现这 5 个与耐药相关的蛋白在耐 CIP 沙门菌中的表达量发生上调,暗示其可能与沙门菌耐药性的产生有关。

3.2 毒力和蛋白质合成相关蛋白

本研究发现 2 个与毒力相关的蛋白分别为细胞侵袭蛋白 SipD 的 A 亚基和锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD),均与以往报道相符,如细胞侵袭蛋白 SipD 在细菌入侵肠道中发挥着重要作用^[18],SipD 的组成部分 A 亚基表达量下降提示 SipD 的表达也出现下调,表明 CIP 耐药株的侵袭力可能变弱;Mn-SOD 能够特异性清除氧自由基,对维持胞内新陈代谢的稳定发挥重要作用^[19]。另外 SOD 还参与细菌生长、毒力和菌膜生成等,如张建康等^[20]研究发现,鼠伤寒沙门菌 *SodA* 基因缺失株的生长速度和菌膜生成能力明显下降;Fang 等^[21]研究发现,链球菌中 Mn-SOD 参与 2 型链球菌入侵机体后引起的抗自噬反应;这些研究提示鼠伤寒沙门菌在获得 CIP 耐药后致病性可能有所减弱。

本研究发现的 3 个与蛋白质合成相关蛋白分别为蛋白质链伸长因子 EF-Ts、50S 核糖体亚基 L4 和 30S 核糖体 S4 亚基,其中蛋白质链伸长因子 EF-Ts 参与蛋白质合成过程中氨基酸的进位^[22],其在耐 CIP 沙门菌中的表达量发生上调,提示其可能与细菌耐药性产生有关;50S 核糖体亚基 L4 和 30S 核糖体 S4 亚基都是核糖体的必要组成部分,在蛋白质翻译过程中发挥关键作用。以上 3 个蛋白在耐 CIP 沙门菌中的表达量均发生上调,提示 CIP 耐药株可能需要合成更多的蛋白质才能在极端环境中生存。

3.3 代谢相关蛋白

本研究发现 12 个与代谢相关蛋白,值得关注的是,这 12 个蛋白中的 6 个都与细菌的能量代谢相关,如二氢硫辛酸脱氢酶组件蛋白作为丙酮酸脱氢

酶复合体的组成部分,在三羧酸循环中发挥着重要作用;ATP 合成酶是合成 ATP 的关键酶;果糖二磷酸醛缩酶存在于糖酵解的逆反应中,其表达量下调提示糖酵解的作用增强^[23];三磷酸甘油醛脱氢酶作为糖酵解的中心酶,表达量上调也提示糖酵解作用增强;丙二醇利用蛋白 PduB 和 NAD(P)H 硝基还原酶能通过其他途径为菌体供能^[24],说明菌体在极端环境中生存可能需要更多能量来源。这些证据提示 CIP 耐药株在极端环境中生存可能需要更多的能量供给。

另外,6 个代谢相关蛋白在细菌的其他代谢途径中也发挥重要作用,如锰过氧化氢酶能清除细菌体内的活性氧以维持胞内代谢稳定,尤其是在恶劣环境中细菌会因代谢紊乱等原因出现活性氧爆发现象,活性氧浓度过高会对细胞造成严重危害^[25]。杨秀清等^[26]研究发现,锰过氧化氢酶基因缺失株的生长速率和多氯联苯的降解速率变慢。二氢硫辛酰胺转琥珀酰酶和磷酸乙酰基转移酶在蛋白质的琥珀酰化和乙酰化修饰方面发挥着重要作用。假定硫醇-烷基过氧化氢还原酶可以还原硫醇类物质,防止其毒害细胞^[27]。短链脱氢酶是一类依赖 NAD(P)H 的氧化还原酶,具有相似的序列模型和催化机制,在一系列氧化还原反应机制中发挥重要作用。

上述 12 个与代谢相关的蛋白中,三磷酸甘油醛脱氢酶和锰过氧化氢酶是在沙门菌中新发现的差异表达蛋白,提示其与细菌耐药形成相关。

4 结 论

本研究采用二维电泳结合质谱鉴定技术的蛋白质组学方法,比较了鼠伤寒沙门菌耐 CIP 株与标准菌体蛋白表达的差异情况,筛选出与细菌耐药、毒力、蛋白质合成和代谢等相关的差异蛋白质,其中外膜蛋白 OmpA、鞭毛马达开关 FliM、三磷酸甘油醛脱氢酶、锰过氧化氢酶等蛋白在沙门菌中是新发现的差异表达蛋白,为沙门菌潜在的耐药调控靶点。

[参考文献]

- [1] 樊松林. 沙门氏菌病的流行病学及预防 [J]. 中国伤残医学, 2015(6):201-202.
Fan S L. Epidemiology and prevention of salmonellosis [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2015(6):201-202.
- [2] 师红萍,周雪雁,王勇祥,等. 蛋鸡沙门菌分离株生物被膜与耐药相关性研究 [J]. 中国家禽, 2017, 39(2):22-27.
Shi H P, Zhou X Y, Wang Y X, et al. Study on the correlation between biofilm and resistance of *Salmonella* isolates [J]. Chi-

- nese Poultry, 2017, 39(2): 22-27.
- [3] Laponogov I, Veselkov D A, Crevel I M T, et al. Structure of an 'open' clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(21): 9911-9923.
- [4] Farrera G P, Borroto E T, Ramírez F R, et al. Detection of quinolone resistance in *Salmonella typhimurium* pig isolates determined by *gyrA* gene mutation using PCR- and sequence-based techniques within the *gyrA* gene [J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(33): 5079.
- [5] Li X Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(2): 337.
- [6] 王兴华, 王光耀, Te K K, 等. 蛋白质组学研究的原理、技术与应用 [J]. 智慧健康, 2016, 2(4): 7-12.
Wang X H, Wang G Y, Te K K, et al. Principles, techniques, and applications of proteomics research [J]. Journal of Mental Health, 2016, 2(4): 7-12.
- [7] dos Santos K V, Diniz C G, Veloso L C, et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam [J]. Res Microbiol, 2010, 161(4): 268-275.
- [8] 胡晓青. 糖尿病性白内障大鼠与正常大鼠晶状体蛋白质组差异分析 [D]. 吉林: 吉林大学, 2011.
Hu X Q. Analysis of lens protein difference between diabetic cataract rats and normal rats [D]. Jilin: Jilin University, 2011.
- [9] 冯 帅, 汪 莹, 王彬婷, 等. 沙门菌体内耐药性诱导模型的建立和体内外诱导耐药菌基因差异分析 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(12): 1926-1930.
Feng S, Wang Y, Wang B T, et al. Establishment of inducing drug resistance model in *Salmonella in vivo* and analysis of differentially expressed genes *in vitro* and *in vivo* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(12): 1926-1930.
- [10] Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, et al. RND-type drug efflux pumps from gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 377.
- [11] Anes J, McCusker M P, Fanning S, et al. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 587.
- [12] Seeger M A, Van veen H W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters [J]. BBA Proteins and Proteomics, 2009, 1794(5): 725-737.
- [13] Zhou X, Jia F, Liu X, et al. Total alkaloids of *Sophorea alopecuroides*-induced down-regulation of AcrAB-TolC efflux pump reverses susceptibility to ciprofloxacin in clinical multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates [J]. Phytother Research, 2012, 26(11): 1637-1643.
- [14] Ricci V, Tzakas P, Buckley A, et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains are difficult to select in the absence of *AcrB* and *TolC* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(1): 38-42.
- [15] Xue R, Ma Q, Baker M A B, et al. A delicate nanoscale motor made by nature-the bacterial flagellar motor [J]. Advanced Science, 2015, 2(9): 1500126.
- [16] 沈日敏, 刘 卫, 孙 雨, 等. 茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 鞭毛马达基因 *fliN* 与 *fliM* 的功能分析 [J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 882-892.
Shen R M, Liu W, Sun Y, et al. Functional analysis of flagellar motor ANFN ORS571 flagellate motor genes *fliN* and *fliM* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(5): 882-892.
- [17] Smani Y, Fàbrega A, Roca I, et al. Role of OmpA in the multi-drug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(3): 1806-1808.
- [18] Rathinavelan T, Lara-Tejero M, Lefebvre M, et al. NMR Model of PrgI-SipD interaction and its implications in the needle-tip assembly of the *Salmonella*, type III secretion system [J]. Journal of Molecular Biology, 2014, 426(16): 2958-2969.
- [19] 付汉维, 彭礼飞. 锰超氧化物歧化酶的研究进展 [J]. 公共卫生与预防医学, 2010, 21(4): 69-72.
Fu H W, Peng L F. Research progress of manganese superoxide dismutase [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2010, 21(4): 69-72.
- [20] 张建康, 汪 洋, 易 力, 等. 鼠伤寒沙门菌超氧化物歧化酶 *SodA* 基因的表达及其酶活性的测定 [J]. 中国兽医学报, 2017, 47(8): 975-980.
Zhang J K, Wang Y, Yi L, et al. Expression of *SodA* gene of *S. typhimurium* superoxide dismutase and determination of its enzyme activity [J]. Veterinary Sciences in China, 2017, 47(8): 975-980.
- [21] Fang L, Shen H, Tang Y, et al. Superoxide dismutase of *Streptococcus suis* serotype 2 plays a role in anti-autophagic response by scavenging reactive oxygen species in infected macrophages [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 176(3/4): 328-336.
- [22] Wang D, Luo B, Shan W, et al. The effects of EF-Ts and bis-muth on EF-Tu in *Helicobacter pylori*: implications for an elegant timing for the introduction of EF-Ts in the elongation and EF-Tu as a potential drug target [J]. Metallomics Integrated Biometal Science, 2013, 5(7): 888.
- [23] 王 燕. 人工诱导空肠弯曲菌红霉素耐药株的生物学特性及蛋白质组学分析 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2013.
Wang Y. Biological characteristics and proteomic analysis of artificially induced erythromycin resistant strains of *Campylobacter jejuni* [D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2013.
- [24] Yanto Y, Hall M, Bommarius A S. Nitroreductase from *Salmonella typhimurium*: characterization and catalytic activity [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8(8): 1826-1832.

- Experimental Medicine & Biology, 1995, 380: 287-290.
- [14] Laude H, Gelfi J, Lavanant L, et al. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. Journal of Virology, 1992, 66(2): 743-749.
- [15] Deng M Y, Wang H, Ward G B, et al. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 2005, 17(6): 574.
- [16] Ding Z, Fang L, Jing H, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1 [J]. Journal of Virology, 2014, 88(16): 8936-8945.
- [17] Schoggins J W, Rice C M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions [J]. Current Opinion in Virology, 2011, 1(6): 519-525.
- [18] Schneider W M, Chevillotte M D, Rice C M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses [J]. Annual Review of Immunology, 2014, 32(1): 513.
- [19] Vance R E, Isberg R R, Portnoy D A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system [J]. Cell Host & Microbe, 2009, 6(1): 10-21.
- [20] Clementz M A, Chen Z, Banach B S, et al. Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases [J]. Journal of Virology, 2010, 84(9): 4619-4629.
- [21] Zhang Q, Shi K, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by Nsp1 [J]. Virology, 2016, 489: 252.
- [22] Xing Y, Chen J, Tu J, et al. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase [J]. Journal of General Virology, 2013, 94(7): 1554.
- [23] Dang W, Fang L, Shi Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO [J]. Journal of Virology, 2015, 90(4): 2090-2101.
- [24] Ivanov K A, Thiel V, Dobbe J C, et al. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase [J]. Journal of Virology, 2004, 78(11): 5619-5632.
- [25] Chen Y, Cai H, Pan J A, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein Nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3484.
- [26] Chen Y, Su C, Ke M, et al. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex [J]. Plos Pathogens, 2011, 7(10): e1002294.
- [27] Züst R, Cervantesbarragan L, Habjan M, et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5 [J]. Nature Immunology, 2011, 12(2): 137-143.

(上接第 39 页)

- [25] Gaetani G F, Ferraris A M, Rolfo M, et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes [J]. Blood, 1996, 87(4): 1595-1599.
- [26] 杨秀清, 王 洋. N 端缺失的锰过氧化氢酶生理生化特性 [J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 448-456.
- Yang X Q, Wang Y. Physiological and biochemical characteristics of manganese catalase deprived at the N-terminus [J]. Chinese Journal of Microbiology, 2015, 55(4): 448-456.
- [27] 陈超飞. 大肠杆菌烷基过氧化氢还原酶(AhpF-AhpC)的结构与功能研究和大肠杆菌 YcjY 蛋白的结构与功能研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2015.
- Chen C F. Structure and function of *Escherichia coli* alkyl hydrogen peroxide reductase (AhpF-AhpC) and structure and function of *Escherichia coli* YcjY protein [D]. Hefei: Anhui University, 2015.