文章编号: 1001-0580(2008)01-0042-03 中图分类号: R 378.12 文献标识码: A =论 著>

志贺菌敏感株与基因转移耐多药株蛋白组学分析*

宋春花, 黄学勇, 郗园林, 张梅喜, 段广才

摘 要: 目的 对志贺菌敏感株与基因转移耐多药株全菌蛋白进行蛋白质组比较, 寻找细菌耐多药相关蛋白。方法 采用接合基因转移实验对临床分离鉴定志贺菌敏感株进行基因转移耐多药试验; 并对志贺菌敏感株及基因转移耐多药株全菌蛋白进行双向电泳; 电泳图谱采用 Image Master 2D Platinum 软件分析, 并对差异表达蛋白进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MOLDI-TOF-TOF)分析。结果 成功获得志贺菌基因转移耐多药株, 在志贺菌敏感株与耐多药株全菌蛋白质图谱中分析别检出(946±37)和(1 013±157)个蛋白质斑点; 经分析共发现 43 个差异表达的蛋白点, 初步对其中 7 个差异表达蛋白进行质谱鉴定, 基因转移耐多药株中发现 2 个新出现的耐多药相关蛋白分别为成簇插入的 DNA 重复序列(CRISPR)相关蛋白及 Hsp60 的分子伴侣蛋白(Groel-Groes-Adp7); ATP 结合盒(ABC)转运蛋白、胱氨酸合成酶、预测的胞浆脂蛋白表达量上调; 翻译延长因子 Tu 及 DNA 单链结合蛋白表达量下降。结论 对 7 个耐多药相关蛋白鉴定分析表明, 供体菌中一些耐多药相关基因通过基因转移方式插入志贺菌敏感株中并大量表达, 同时一些在细胞代谢中起重要作用的酶类表达量上调, ABC 转运蛋白在志贺菌基因转移耐多药机制中也起重要作用。

关键词: 志贺菌; 耐多药; 蛋白质组学; 双向电泳; 质谱分析; 差异表达

Analysis on proteomics between sensitive strain and gene transferred multi-drug resistant strain of shigella flexneri

SONG Chun-hua, HUANG Xue-youg, XI Yuan-lin, et al. School of Medicine, Zhengzhou University (Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Objective In order to search for the new proteins realated to multi-drug resistance, the proteomics of whole cellular proteins between sensitive strain and gene transferred multi-drug resistance strain of shigella flexneri by using of two-dimensional electrophoresis (2-DE) were compared. Methods Clinical sensitive isolates shigella flexneri was transduced to multi-durg resistance stain by conjugation experiment, immobilized pH gradient (IPG) two-dimensional electrophoresis was adopted and the gels were analyzed by Image Master 2D Platinum software, matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to analyze differential expression proteins. Results Gene transferred multi-durg resistance strain of shigella flexneri was obtained successfully. It was found that there were (946±37) protein spots in whole cellular protein 2-DE gels of sensitive strain, and (1013±157) protein spots in that of gene transferred multi-durg resistance strain, 43 differential expression protein spots were found and 7 proteins related to multi-drug resistance were identified based on peptide mass fingerprinting. CRISPR-associated protein and Groel-Groes-Adp7 were two novel proteins; ATP binding cassette transporter protein, cysteine synthase and predicted periplasmic or secreted lipoprotein protein were high expression in gene transferred multi-durg resistance strain; But China elongation factor EF-Tu and SSB were high expression in sensitive strain. Conclusion By mass spectrum analysis of 7 proteins related to multi-durg resistance, it was found that some genes related to multi-durg resistance of donator were transferred into sensitive stain and expressed highly as well as some important cellular metabolism enzymes. ATP binding cassette transporter protein influenced seriously in multi-durg resistant mechanism of shigella flexneri.

Key words: shigella flexneri; multi-drug resistance; proteomic; two-dimensional electrophoresis; mass spectrum analysis; different expression

志贺菌引起的细菌性痢疾发病率居我国传染病发病率的前 3 位。近年来, 随着抗生素的广泛使用甚至滥用, 造成志贺菌频繁发生变异产生耐药株, 不断给细菌性痢疾的防治带来新的挑战。1996 年, 痢疾志贺菌被 WHO 认定为给人类带来巨大威胁的耐药性菌株。因此, 探讨志贺菌耐多药的机制成为目前解决志贺菌耐多药的先决条件。本课题选取对抗生素敏感的 1 株志贺菌为受体菌, 以 1 株耐多药大肠埃希菌为供体菌, 以接合转移方式构建出耐多药菌株, 通过比较敏感株与基因转移耐多药株蛋白质双向电泳图谱, 研究志贺菌耐多药相关蛋白, 并对表达差异蛋白进行基质辅助激光解析飞行时间质谱(MOLDI-TOF-TOF)分析和数据库检索, 旨在探索其耐多药机制。

* 基金项目: 河南省科技公关项目(0424410035)
作者单位: 郑州大学公共卫生学院, 河南 450001
作者简介: 宋春花(1974-), 女, 河南荥阳人, 讲师, 博士, 研究方向: 分子流行病学。
通讯作者: 段广才

1 材料与方法

1.1.1 材料

1.1.1.1 菌株 (1) 福氏痢疾杆菌标准株: 菌株号 51571-9 (中国药品生物制品检定所); (2) 敏感株及耐多药大肠埃希菌; 采用改良 K-B 纸片法, 从临床分离鉴定的志贺菌株中, 筛选 1 株对头孢噻吩(CF)、诺氟沙星(NOR)、庆大霉素(GM)、磺胺甲基异恶唑(SMZ)均敏感的福氏志贺菌作为敏感株; 对以上 4 种抗生素均耐药的致病性大肠埃希菌为接合基因转移实验的供体菌。

1.1.1.2 试剂与仪器 头孢噻吩等抗生素均为标准品(中国药品检验中心)。固相 pH 梯度干胶条(immobiline pH gradient pH3~10, L=24 cm); 固相 pH 梯度(IPG)缓冲液、IPG 覆盖液、两性电解质(pharmalyte; pH3~10)、3-[3-胆酰胺丙基)-乙二胺]-1-丙磺酸(CHAPS)(美国 Amersham Pharmacia 公司)。丙烯酰胺、尿素(urea)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、蛋白酶抑制剂丙甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑蛋白酶肽

(leupeptin)(美国 Sigma 公司)。固相 pH 梯度等电聚集仪 IPGphor IEF System,垂直板电泳仪、ImageScanner 光密度扫描仪、图像分析系统(美国 Amersham Pharmacia 公司)。

112　方法

11211　志贺菌敏感株与耐多药大肠埃希菌接合转移实验　参照文献[12]进行。经此实验,将获得 1 株志贺菌基因转移耐多药株。用标准株作对照。

11212　蛋白质双向电泳　(1)蛋白提取方法:采用超声兼 Urea-CHAPS-DTT-SB_{3-10}裂解提取法[122],略作改进。(2)可溶性总蛋白定量:应用 BradFord 法[132]对提取的可溶性总蛋白进行定量;(3)第一相固相 pH 梯度等电聚焦:按文献[142]。程序分别为 30 V 7 h, 60 V 7 h, 150 V 015 h, 300 V 1 h, 600 V 1 h, 8 000 V 12 h。(4)平衡:按文献[132]。(5)第二相垂直板聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:按文献[132]。(6)染色:银染按 Amersham Bioscience 的银染方案稍作改进[142]。考马斯亮蓝染色按 Neuhoff 等方法进行[152]。(7)图像扫描分析:用 Amersham Bioscience 的扫描仪投射扫描,分辨率为 300 dpi。数字化图像文件运用 Image Master 2D Platinum 软件分析。图像分析过程包括蛋白质班点的检测、量化、背景扣除、匹配。蛋白质班点经自动检测后进行手工校对,匹配之前选取 1 块胶作为参考凝胶,其他凝胶都与之匹配。

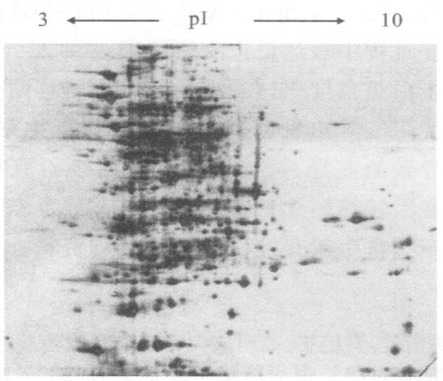
11213　质谱分析　(1)质谱样品制备:比较双向电泳图谱,找到差异蛋白,切下 1 mm^3,置于 115 ml 的 Eppendorf 管中,按文献[162]方法处理样品。(2)质谱鉴定:样品按照 1B1 的比例,与含有 A-氰基-羟基苯丙烯酸的 50% 乙腈/01 1% 甲酸的溶液混合。所有质谱在 4700 型 MALDT TOF-TOF 蛋白质分析系统下获得。选择反射式阳离子捕获方式,质量精确度为 50 mg/L;质谱(MS)光谱质量范围 800~4 000 Da。

11214　数据库检索　(1)光谱分析:采用 Mascot(http: M prospector. ucsf. edu)和 Profound(http: M129. 85. 19. 192/proFound-bin/WebProFound. exe)软件进行处理和分析;搜索在美国国立生物技术信息中心(NCBInr)蛋白数据库进行;(2)搜索参数设置:相对分子质量误差范围? 20%,肽片段相对分子质量误差范围? 015 Da,每个肽允许有 1 个不完全裂解位点,物种选择细菌;(3)蛋白质身份确定:根据搜索结果并结合蛋白质在凝胶上的等电点和相对分子质量进行最终确定:要求肽段覆盖率> 15%,匹配肽段至少 4 个,等电点和相对分子质量与观察值基本相符。

2　结　果

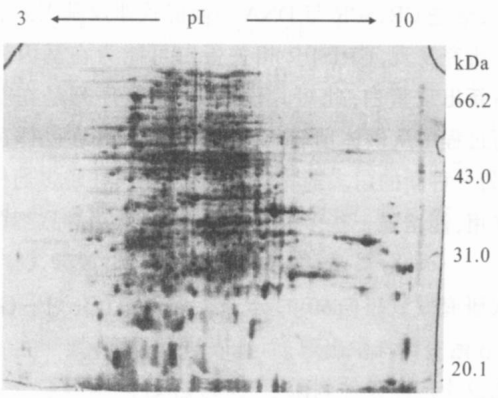
211　接合转移耐多药基因结果　志贺菌敏感株的最低抑菌浓度(MIC 分别为头孢噻吩 32 Lg/ml,诺氟沙星 01 5 Lg/ml,庆大霉素 2 Lg/ml,磺胺甲基异恶唑 512 Lg/ml。与耐多药大肠埃希菌进行接合转移后,获得最低抑菌浓度分别为敏感株 8 倍和 10 倍的基因转移耐多药志贺菌。将基因转移耐多药志贺菌作药敏试验,结果 4 种抗生素抑菌环直径均为 0 cm。

212　蛋白质双向电泳图谱比较　相同实验条件及参数设置情况下,对志贺菌可溶性总蛋白重复 3 次进行双向电泳分离。结果显示,敏感株 3 次双向电泳图谱非常相似,蛋白质上样量为 10 Lg, pH3~10;24 cm 线性干胶条通过 Image Master 2D Platinum 分析软件进行点检测,获得(946? 37)个蛋白质斑点(图 1)。志贺菌基因转移耐多药株获得 3 块凝胶的平均蛋白质点数为(1013? 157)个(图 2)。经过背景消减,将其中 1 块胶作为参考凝胶进行匹配,匹配点数(998? 24)个,匹配率 981 52%。



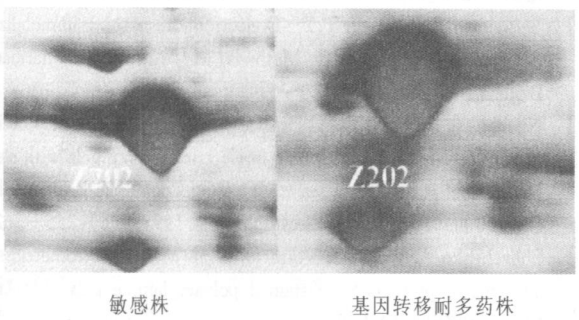
注:蛋白质上样量 100 Lg;第一向 pI3-10,24 cm 线性干胶条;第二向应用 1215% 聚丙烯酰胺凝胶(银染)。

图 1　志贺菌敏感株蛋白质双向电泳图谱



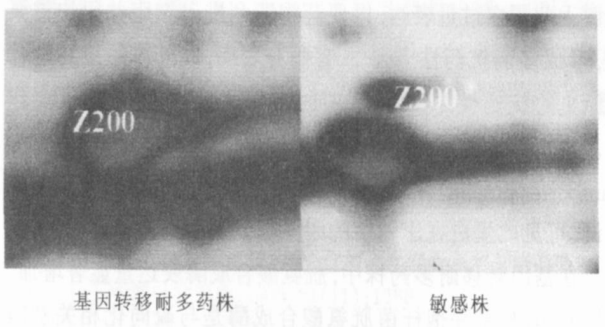
注:蛋白质上样量 100 Lg;第一向 pI3-10,24 cm 线性干胶条;第二向应用 1215% 聚丙烯酰胺凝胶(银染)。

图 2　志贺菌基因转移耐多药株蛋白质双向电泳图谱



注:Z202 号蛋白只存在于基因转移耐多药株。

图 3　只存在于基因转移株中蛋白质点



注:Z200 号蛋白在基因转移耐多药中表达量增加。

图 4　表达量有差别的蛋白质点

213 蛋白质差异表达谱 以基因转移耐多药株为参考凝胶,与敏感株进行双向凝胶图谱匹配,共发现 43 个差异表达的蛋白点,其中 8 个蛋白点只存在于基因转移耐多药株中,6 个蛋白点只存在于敏感株中,还有 29 个蛋白点在 2 株菌株中表达量相差 5 倍以上,其中 22 个蛋白点随着志贺菌由敏感株向耐多药株转变而表量增加,7 个蛋白点表达量下降(图 3,图 4)。

214 质谱鉴定(表 1) 在考马斯亮蓝染色凝胶上选取 7 个在基因转移耐多药株表达量增加的差异点进行肽指纹图谱鉴定,其中 Z202、Z204 为新出现蛋白,Z200、Z201、Z98 号点表达量增加,72,14 号表达量下降。

表 1 志贺菌基因转移耐多药株表达量上调蛋白质谱鉴定结果

蛋白序号	SWISS- PROT 登陆序列号	最高分	分子量	等电点	序号 覆盖率(%)	蛋白质(分类)
Z98	NCBInIr gi| 75242664	178	59255	5196	30	ABC- type dipeptide transport system, periplasmic(Escherichaia coli F11)
Z024	NCBInr gi| 76795666	80	34906	5123	29	CRISPR- associated protein TM1801 [Thermoanaerodbacter ethanolicus ATCC 33223]
Z202	NCBInr gi| 61679964	211	55124	4187	49	Chain N, Groel- Grose- Adp7 (Escherichia coli)
Z200	NCBInr gi| 75187168	209	34484	5183	71	Cysteine synthase[Escherichia coli E24377A]
Z201	NCBInr gi| 71176024	84	19388	5143	42	Predicted periplasmic or secreted lipoprotein[shigellaboydii BS512]
14	NCBInr gi| 91212815	175	44852	5125	45	translation longation factor EF- Tu Escherichia coli U/TI89
72	NCBInr gi| 9954966	108	12883	9104	62	Chain D, Crystal Structure of Chymotryptic Fragment of E. coli Ssb Bound To Two 35- Mer single Strand Dnas

3 讨 论

Jansen R 等[172]发现,一个新的主要在原核细胞中出现的规律的成簇插入的 DNA 重复序列(CRISPR),片段大小约为 21~ 37 bp,此可移动重复序列存在于半数以上的原核生物基因组中[182],这些 CRISPR 与 DNA 的新陈代谢及基因的表达有关[192]。本研究发现,CRISPR 相关蛋白可能为在基因转移耐多药株中新出现蛋白,此短片段 DNA 重复序列是在基因转移耐多药过程中从供体菌转移入受体菌中,并在受体菌中表达,可能为一种新的耐多药相关蛋白,推测其在耐多药机制中起调节作用,能增强一些多药基因的表达,从而导致细菌出现耐多药。

本次研究发现,Hsp60 的分子伴侣蛋白(Groel- Groes- Adp7)仅在耐多药株中出现,而且表达量很高,推测在大剂量药物冲击这个应激条件刺激下,编码 groel 的基因整合入志贺菌敏感株基因组中,并在新宿主菌中大量表达,防止新生的耐多药相关蛋白质发生聚集或折叠,保证它们的正确构象并增强它们的活性,籍此适应新的宿主环境。

ABC 外排系统为细菌耐多药主动流出机制之一,肿瘤细胞膜上此蛋白过量表达,以便药物顺利进入细胞并很快被泵出,形成多药抗药性[110, 112]。有研究表明,此外排系统在利什曼原虫的抗药性中[122]及真菌的多药耐受性中[132]起重要作用。本文结果显示,98 号 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporter protein)在志贺菌基因转移耐多药株中表达量明显上调,可见此蛋白在志贺菌的耐多药机制中也起重要作用。

在基因转移耐多药株中,胱氨酸合成酶表达量显著增加。研究表明,枯草芽孢杆菌胱氨酸合成酶是与硫同化相关基因表达的一个通用负调控子[142],但此酶在志贺菌耐多药中的作用机制尚不清楚,推测此酶在耐多药机制中起着调控子的作用。质谱分析结果表明,一种分子量为 19 388Da 预测的胞质蛋白在基因转移株表达量显著增加,可能与药物的转运及耐多药信号的传导有关,但其与耐多药相关功能尚需进一步作 N 端或 C 端测序。本次结果表明,14 号 EF- Tu 在志贺菌敏感株中表达量高。研究表明[152],此翻译延长因子在大肠埃希菌中表达量增加。72 号单链 DNA 结合蛋白(SSB)在敏感株向耐多药株转变过程中表达量也有所下降。

本文从全蛋白组角度探讨志贺菌的基因转移耐多药机制并且在实验中使用一株出发菌通过基因转移产生耐多药,排除菌株不同而导致的差异,可比性较高。后续研究将会发现更多与志贺菌基因转移耐多药相关蛋白,从而为志贺菌耐多药分子机制及新型抗生素开发研制提供基础资料。

参考文献

1 12 刘志远,许淑珍,马纪平.高耐庆大霉素粪肠球菌质粒接合转移试验的方法探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 5(6): 12- 14.

1 22 贾继辉,于修平,郭辉玉,等. 幽门螺杆菌蛋白质组双向电泳图谱的构建及其相关技术体系的建立[J]. 山东大学学报: 医学版, 2003, 41(3): 225- 227.

1 32 Marshak DR, Kadonaga j T, Burgess RR, et al. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 158- 159.

1 42 Berkelman T, Stenstedt T. 2- D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles & Methods[M]. Amersham Pharmacia Biotech Inc Press, 1998: 14- 25.

1 52 Neuhoff V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G- 250 and R- 250[J]. Electrophoresis, 1998, 9(6): 255- 262.

1 62 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric se2 quencing of proteins Sil- stained polyacrylamide gels[J]. Anal Chem, 1996, 68(5): 850- 858.

1 72 Jansen R, Embden JD, Gaastra W. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Mol Microbiol, 2002, 43(6): 1565- 1575.

1 82 Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, et al. Evidence for lateral gene

中国公共卫生 CPH

transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima[J]. Nature, 1999, 399(6734): 323- 329.
1 92 Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR - associated(Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. PLoS Comput Biol, 2005, 1(6): 0474- 0483.
1102 Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P - glycoprotein[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(1): 1- 6.
1112 Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition[J]. Toxicology, 2002, 181- 182; 291- 297.
1122 Loiseau PM, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators[J]. Curr top Med Chem, 2006, 6(5): 539- 550.
1132 Sipos G, Kuchler K. Fungal ATP- binding cassette(ABC) transporters in drug resistance & detoxification[J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(4): 471- 481.
1142 Albanesi D, Mansilla MC, Schujman GE, et al. Bacillus subtilis cysteine synthetase is a global regulator of the expression of genes involved in sulfur assimilation[J]. J Bacteriol, 2005, 187(22): 7631 - 7638.
1152 Nguyen LD, Holub M, Kalachova L, et al. Post - translational modification(s) and cell distribution of streptomyces aureofaciens translation elongation factor Tu overproduced in Escherichia coli[J]. Folia Microbiol(Praha), 2005, 50(5): 393- 400.

收稿日期: 2007205228　(孔繁学编辑　郭长胜校对)

文章编号: 1001-0580(2008)012-0045-01　中图分类号: R 516.3　文献标志码: B　=基层公共卫生>

大石桥市 1990~ 2006 年乙型肝炎流行病学分析

郝庆智, 王莉

为了解辽宁省大石桥市病毒性乙型肝炎流行特征, 以指导今后乙肝防治工作, 对大石桥市 1990~ 2006 年乙型肝炎发病情况进行分析。现将结果报告如下。

材料与方法　资料来源于本市历年的疫情年报表、月报表、传染病登记资料, 免疫规划管理资料, 乙肝病例个案调查资料。采用描述流行病学方法进行分析。

结　果　(1) 流行情况: 1990~ 2006 年, 乙肝发病率波动在 26.85/10 万~ 199.57/10 万之间, 平均为 59.13/10 万。最高为 1991 年, 最低为 1994 年(图 1)。(2) 时间分布: 全年各月均有发病, 1~ 12 月平均发病百分构成依序为 7.29%, 5.54%, 9.29%, 7.96%, 11.07%, 11.42%, 9.45%, 10.29%, 8.87%, 7.17%, 6.97%, 4.67%。(3) 地区分布: 全市 5 个城区、13 个农村镇均有发病, 石桥管理区发病率最高为 246.24/10 万, 城镇发病率为 85.59/10 万, 农村为 42.79/10 万。(4) 人群分布: 男性发病 5 000 例, 女性发病 2 025 例, 男女性别比为 2.47:1。0~ 80 岁之间均有发病, 1990~ 1992 年, 10 岁以下儿童发病 613 例, 占 19.44%; 14 岁以下儿童发病 817 例, 占 25.91%。1993~ 2006 年, 10 岁以下儿童发病 325 例, 占 8.39%; 14 岁以下儿童发病 510 例, 占 13.17%。1990~ 2006 年, 10 岁以下儿童发病 938 例, 占 13.35%; 14 岁以下发病 1 327 例, 占 18.89%。各职业均有发病, 其中农民发病 2 387 例, 占 33.98%; 工人发病 1 607 例, 占 22.88%。

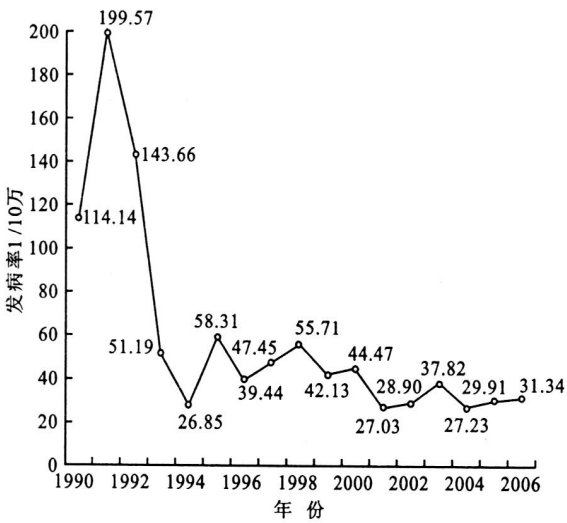


图 1　1990~ 2006 年大石桥市乙型肝炎发病曲线

讨　论　1992 年以前, 大石桥市乙肝发病均维持在 100/10 万以上的较高发病率水平, 自 1993 年, 发病率降到 60/10 万以下, 并且一直波动在 26.85/10 万~ 58.31/10 万之间。1992 年辽宁省将乙肝疫苗纳入计划免疫管理, 新生儿按计划进行乙肝疫苗接种[112]。大石桥市也将乙肝疫苗纳入计划免疫管理, 接种率一直维持在 85% 以上, 新生儿接种及时率也在 70% 以上, 至 1993 年乙肝总的发病率明显下降。2002 年, 市卫生局下发文件通知, 规定大石桥市从 2002 年 7 月 1 日起, 正式实施新生儿乙肝疫苗免费接种, 对乙型肝炎的预防起到了很大作用。

参考文献

1 12　姚文清, 陈称, 刘敏, 等. 辽宁省病毒性肝炎疫情分析及防制对策[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(11): 1388.

收稿日期: 2007207226　(郭长胜编校)

作者单位: 辽宁省大石桥市卫生防疫站, 115100
作者简介: 郝庆智(1962-), 男, 辽宁营口人, 主管医师, 本科, 主要从事疾病预防控制工作。