

幽门螺杆菌适应性定植蒙古沙鼠前、后的蛋白质组学研究

郭 刚, 童文德, 曾 浩, 刘开云, 邹全明*

(第三军医大学 临床微生物学及免疫学教研室 重庆 400038)

摘 要: 为比较研究幽门螺杆菌(*Hp*)适应性定植蒙古沙鼠前后的蛋白表达谱变化, 将 *Hp* 临床分离株感染沙鼠, 并体内连续传代, 驯化一株高适应性菌株, 然后采用双向电泳和质谱技术对适应性变化前后两株菌的差异蛋白进行鉴定。结果表明, 随着 *Hp* 临床株在沙鼠体内的连续传代, 感染率逐渐升高, 第 10 代后, 感染率稳定在 90% 以上。适应性定植后, *Hp* 蛋白谱发生了变化。在选择的 5 个候选差异蛋白点中, 共鉴定出 4 个蛋白, 分别为 *Hp* 菌的功能未知的 HP0318 编码蛋白、氢化酶表达/形成蛋白(*hypB*)、异柠檬酸脱氢酶(*icd*)、ADP-L-D-甘露庚糖表异构酶(*rfaD*)。上述鉴定蛋白可能与 *Hp* 适应性定植具有很大的相关性。

关键词: 幽门螺杆菌 适应性变异 蒙古沙鼠 双向电泳

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0461-04

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)是人类消化道疾病的重要病原。目前人类对其生物学特点、致病机制及其与宿主的关系等方面均尚未完全阐明。随着对 *Hp* 在分子水平上的研究不断深入, 人们发现 *Hp* 较其它细菌表现出更高的生物多样性, 提示该菌面对复杂的定居环境, 具有高度的变异性和独特的适应性机制^[1-3]。本研究将 *Hp* 临床分离株在沙鼠体内连续传代进行驯化, 建立稳定的沙鼠感染模型, 然后采用双向电泳技术, 对适应性定植前后的 *Hp* 菌株的蛋白质表达谱进行比较研究, 拟发现与适应性改变相关的蛋白因子, 为丰富对 *Hp* 适应性定植的深层次认识提供理论依据, 进而有助于进一步分析其定植与致病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株试验动物: *Hp* 菌株分离自重庆市西南医院慢性胃炎患者胃内。8 周龄雄性蒙古沙鼠由浙江省实验动物中心提供。

1.1.2 试剂和仪器: *Hp* 脑心浸液培养基由本室自制。IPG 胶条(pH3 ~ 10, 17cm)和缓冲液及 CHAPS 购自 Bio-Rad 公司, 硫脲、超纯尿素、DTT、TBP 购自 Sigma 公司。*Hp* 培养装置: 抽气换气培养罐, 由本室

自行研制。饲喂针($\phi 0.9 \times 150\text{mm}$)购自上海茂生生物科技有限公司。PROTEAN IEF System 等电聚焦系统、PROTEAN II Cell 垂直电泳系统、PDQuest6.0 图像分析软件以及 Chemi Doc 化学发光成像系统均为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 *Hp* 感染沙鼠适应株的驯化

将 3 株 *Hp* 临床分离株分别口服感染 20 只蒙古沙鼠, 4 周后剖杀, 检测 *Hp* 并计算感染率(感染沙鼠数量/存活试验沙鼠数量), 然后将新鲜分离菌株再次感染 20 只沙鼠, 4 周后再剖杀检测, 再感染, 如此连续在沙鼠体内进行传代, 直至感染率稳定在 90% 以上, 从而获得一株高感染力的 *Hp* 沙鼠适应菌株。

1.3 全菌蛋白样品的制备及定量

将驯化得到的 *Hp* 适应株及原代株用脑心浸液肉汤培养 22h, 离心收集菌液并洗涤, 分别加入样品裂解液(7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65mmol/L DTT, 0.2% Bio-Lyte, 0.5mmol/L PMSF) 1mL, 混悬后置冰水浴中超声破菌, 功率 300W, 15s/次, 间歇 15s, 共 20 次。每管中再加入 200g/mL 的 DNase I 和 50g/mL 的 RNaseA, 4℃放置 30min, 然后 15000r/min 离心 30min, 取上清用 Brad-ford 法测蛋白浓度。

基金项目: 国家“十一五”重大科技专项(2003AA2Z3C64), 国家自然科学基金(30400019)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-23-68752316, E-mail: qmzou@mail.tmmu.com.cn

作者简介: 郭 刚(1970-) 男, 四川宜宾县人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事病原细菌诊防研究。Tel 86-23-68752315;

E-mail: guog@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2006-09-01 接受日期: 2006-10-23 修回日期: 2006-12-13

1.4 双向凝胶电泳

取水化上样缓冲液(7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65mmol/L DTT, 0.2% Bio-Lyte, 0.001% 溴酚蓝) 400 μ L 加入 100 μ L 样品, 使蛋白量达到 800 μ g。采用胶内泡胀法水化 13h, 再按设定程序(250V 1h, 1000V 1h, 10000V 线性 5h, 10000V 快速 6h, 17 $^{\circ}$ C) 进行等电聚焦。聚焦结束, 进行胶条的平衡。然后立即转移至 12% SDS-PAGE 凝胶, 用 PROTEAN II Cell 作第二向电泳, 最后作常规考马斯亮蓝染色。

1.5 图像分析

采用 ChemiDoc 化学发光成像系统对 2-DE 凝胶进行扫描, 然后采用 PDQuest6.0 软件产生光密度图像并进行分析处理。分析总蛋白质点数目、凝胶图像的相关性以及根据光密度值的变化来判断蛋白斑点表达量的变化。

1.6 差异候选蛋白的 MALDI-TOF-MS 鉴定

切取 5 个具有显著量变的蛋白点或仅在某一个菌株的 2-DE 图谱中被检测到的蛋白点凝胶块作脱色和胶上原位酶解, 提取肽混合物, 送军事医学科学院国家生物医学分析中心用 MALDI-TOF-MS 测定肽质量指纹图。最后将测得的肽片段质量数输入 SWISS-PROT 数据库进行检索鉴定。

2 结果

2.1 *Hp* 感染沙鼠及连续体内传代

从临床分离的 3 株 *Hp* 菌初次感染蒙古沙鼠, 其中两株菌感染的 20 只沙鼠中均未分离出 *Hp*, 另外一株感染后 4 周, 从 2 只感染沙鼠胃内分离培养出 *Hp* 菌, 我们将其中克隆数较多的一株确定为建立模型的感染菌株, 命名为 M_0 。随着 M_0 在沙鼠体内的连续传代, 感染率逐渐升高, 传代至第 10 代 (M_{10}) 以后, 感染率稳定在 90% 以上。

2.2 制备型 2-DE 对幽门螺杆菌 M_0 和 M_{13} 株全菌蛋白的分离

2-DE 结果显示两个菌株的总蛋白分布模式非常相似, 蛋白质斑点主要集中于 pH4~8 之间的范围, 极端酸性蛋白与极端碱性蛋白较少, 蛋白质相对分子量主要集中于 $(10 \sim 100) \times 10^3$ (图 1); 软件在 M_0 和 M_{13} 株的电泳图上分别检测到 564 ± 32 和 602 ± 27 个蛋白点, 两个电泳图谱的平均相关系数为 0.78。经综合考虑, 我们选择了差异最明显, 点光密度值较大的 5 个蛋白点进行肽质量指纹图谱鉴定。其中第 3 点仅在 M_{13} 的 2-DE 图谱中被 CBB 染色检测到, 第 1、4、5 点的表达量有显著升高, 而第 2 点仅在 M_0 的 2-DE 图谱中被 CBB 染色检测到。

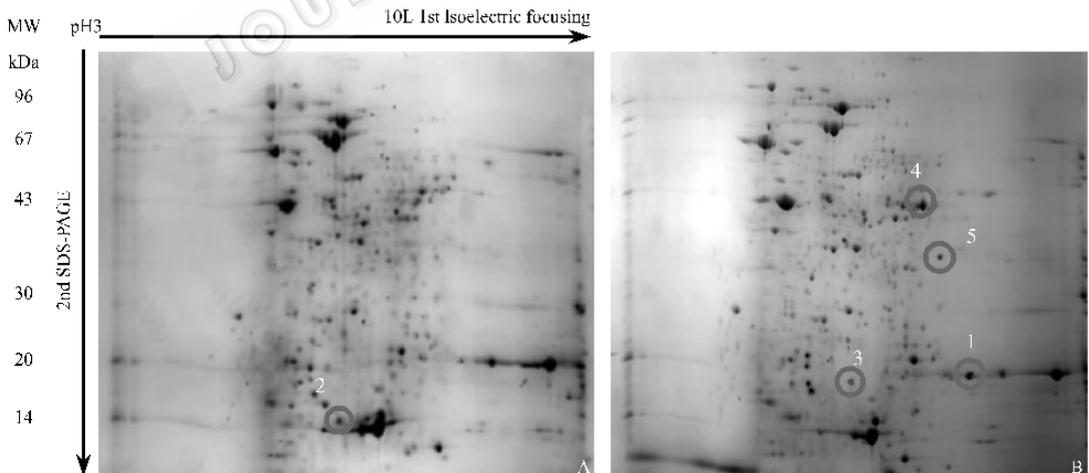


图 1 幽门螺杆菌菌株 M_0 (A) 及其沙鼠适应株 M_{13} (B) 的比较 2-DE 图谱 (pH3-10L, CBB 染色)

Fig. 1 Representative 2-DE gels between strains M_0 and M_{13} of *H. pylori* (pH3-10L, CBB).

2.3 差异候选蛋白的 MALDI-TOF 质谱鉴定

5 个候选蛋白点的凝胶块经过胶内胰蛋白酶酶解, 然后用 MALDI-TOF 质谱进行检测分析, 得到 5 组肽质量指纹图 (Peptide Mass Fingerprinting, PMF) 数据 (表 1)。

经数据库查询, 结合该蛋白在 2-DE 图谱上大概的分子量与等电点, 以蛋白匹配分值大于 70 作为鉴定依据, 共鉴定出 4 个有意义的蛋白质。第 1、3、4、5 蛋白点分别为 *Hp* 菌的 HP0318 编码蛋白、氢化酶表达/形成蛋白 (hypB)、异柠檬酸脱氢酶 (icd)、ADP-L-

表 1 差异候选蛋白在 M_0 和 M_{13} 株 H_p 菌中的相对 OD 值及 PMF 数据Table 1 The relative OD value and peptide mass fingerprinting (PMF) data of differentially expressed protein spots between strains M_0 and M_{13} of *H. pylori*

Protein spot	OD value(mean SD)		PMF data
	M_0	M_{13}	
1	19.73 ± 2.05	63.19 ± 12.91	1283.48 1355.72 1483.58 1502.03 1512.50 1548.71
			1564.73 1603.75 1611.69 1630.75 1920.03 1940.78 1963.98 1999.93 2016.96 2289.13 3161.60 3177.65
2	30.36 ± 5.23	(-)	1116.75 1229.79 1283.81 1300.80 1372.72 1506.80 1533.92 1615.87 1682.99 1912.04 1926.07 1986.11 2233.24 2249.22 2359.44 2375.44 2386.56
3	(-)	25.78 ± 5.84	1205.14 1241.60 1257.59 1268.54 1396.75 1437.68 1460.77 1482.78 1672.89 1685.89 1701.80 1800.96 1816.96 1894.94 2090.06 2106.04 2985.48 2289.16 2355.21
4	10.74 ± 1.82	58.83 ± 7.64	936.55 1254.73 1340.71 1382.84 1468.80 1630.84 1672.03 1886.97 1891.96 1902.96 2047.05 2175.16 2225.97 2231.16 2241.94 2273.20 2278.25 2294.24 2310.23 2363.28 2525.32 2881.66 2897.64 3180.72
5	5.92 ± 0.78	22.27 ± 3.74	1249.09 1271.00 1300.65 1320.57 1429.75 1476.08 1637.88 1652.84 1665.95 1992.08 2310.34 2347.18 2363.14 2772.14

D-甘露庚糖表异构酶(rfaD)。其中 1 号点查询结果见图 2, 大于 70 分值的匹配蛋白有两个, 均为 H_p 26695 株与 J99 株的同一蛋白, 其数据库编码分别为 gi|15644946、gi|15611370。

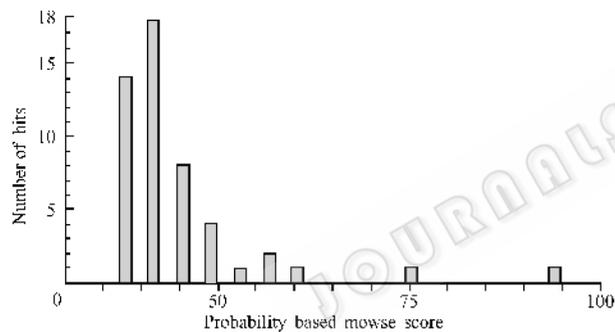


图 2 蛋白点 1 肽质量指纹图的 Mascot 检索结果

Fig.2 Mascot search results of spot 1. Protein scores greater than 70 are significant ($P < 0.05$).

3 讨论

国内外^[3,4]建立比较稳定的 H_p 感染模型均是通过长期体内驯化适应菌株来完成, 如 Lee 建立 BALB/c 小鼠模型, 通过传代获得 SS1 适应株, 因此本研究对 H_p 临床分离株进行了沙鼠体内的连续传代感染, 诱导其通过某种适应性变异机制而不断提高其适应性定植能力, 以获得稳定的沙鼠模型和高感染力的适应性菌株。从结果看, 我们经过 10 余代的连续感染后, 感染率可稳定在 90% 以上。

蛋白质分离的主流技术目前仍然是双向电泳。我们采用该技术对 H_p 菌株 M_0 及其沙鼠适应性菌株 M_{13} 全菌蛋白进行了分离, 经过摸索和优化试验条件, 两株菌的 2-DE 蛋白表达图谱匹配性较高, 两

图谱之间的的相关系数达到 0.78, 表明两者已具有一定的可比性, 也说明来源于同一亲代菌株的 M_0 与 M_{13} 大部分蛋白仍维持相同, 而少部分的差异蛋白则提示发生了适应性改变。

在鉴定出的 4 个差异蛋白中 HP0318、RfaD 及 Icd 在高感染力的 M_{13} 菌株胞内均显著高表达, HypB 则仅在 M_{13} 中发现。RfaD 基因首先从大肠杆菌内发现, 然后先后在沙门氏菌和流感嗜血杆菌中得到证实, 它主要参与合成革兰阴性菌 LPS 中的核心多糖。LPS 在维持细菌外膜完整性方面、在细菌与宿主的相互作用中以及对免疫调节均具有重要作用^[8]。国外有学者^[9]已发现在小鼠体内能定植的 H_p 菌株 LPS 分子内具有 O-特异性侧链, 不能定植的菌株很少甚至不含 O-特异性侧链。该报道与我们的结果提示 rfaD 可能通过对 LPS 分子的调控来适应性定植于沙鼠胃内。HypB 属于一组命名为 Hyp 的蛋白, 主要参与细菌氢化酶的形成与成熟, 而氢化酶是 H_p 重要的毒力因子。研究^[10]已证实当 H_p 与氢共同孵育时, 其氢化酶活性可提高 5 倍以上; H_p 在小鼠胃内可利用氢, 并大大提高其定植力, 氢化酶缺失菌株在小鼠体内的定植力则会显著降低。由于与人胃环境相比, 鼠胃内定居的细菌种类复杂、数量繁多。这些细菌会产生大量的代谢性氢分子, 因此, H_p 产生高活性的氢化酶就能充分利用这种能量代谢底物, 大量繁殖, 从而适应性定植于鼠胃内。可见 HypB 作为 Hyp 蛋白中的一员, 对 H_p 在鼠胃内的适应性定植具有举足轻重的作用。

从上述分析可知, 本研究筛选鉴定的 4 个差异表达蛋白有两个基本可以确定与 H_p 的适应性定植

相关,对于筛选到的另一个高表达蛋白质是 HP0318 基因编码蛋白,目前尚属于功能未知的推定蛋白基因^[11]。可以推测 HP0318 与 Hp 的适应性定植也可能具有很大的相关性。当然,该结论尚需通过进一步的功能学研究来进行证实。

参 考 文 献

- [1] Logan RPH, Berg DE. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 1996, **348**(9040):1462-1463.
- [2] Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, *et al.* Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 2000, **181**(1):273-282.
- [3] Lee A, O'Rourke, DeUngra MC, *et al.* A standardized mouse model of *H. pylori* introducing the Sydney strain. *Gastroenterol* 1997, **112**(4):1386-1397.
- [4] Akopyants NS, Eaton KA, Berg DE, *et al.* Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1995, **63**(1):116-121.
- [5] Lee HW, Choe YH, Kim DK, *et al.* Proteomic analysis of a ferric

uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics*, 2004, **4**(7):2014-2027.

- [6] Bumann D, Jungblut PR, Meyer TF, *et al.* *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics*, 2004, **4**(10):2843-2848.
- [7] Govorun VM, Moshkovskii SA, Tikhonova OVC, *et al.* Comparative analysis of proteome maps of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry-(Mosc)*, 2003, **68**(1):42-49.
- [8] Kneidinger B, Marolda C, Graninger M, *et al.* Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-beta-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2002, **184**(2):363-369.
- [9] Moran AP, Sturegard E, Sjunnesson H, *et al.* The relationship between O-chain expression and colonization ability of *Helicobacter pylori* in a mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, **29**(4):263-270.
- [10] Olson JW, Maier RJ. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* 2002, **298**(5599):1788-1790.
- [11] 胡福泉. 微生物基因组学. 北京:人民军医出版社, 2002 406-433.

Comparative proteomics analysis of *Helicobacter pylori* after adaptive colonization in Mongolian gerbils

GUO Gang, TONG Wen-de, ZENG Hao, LIU Kai-yun, ZOU Quan-ming*
(Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract To study adaptive protein variation of *H. pylori* after colonization in Mongolian gerbils, Firstly, Clinical isolated strain M₀ of *H. pylori* were inoculated into Mongolian gerbils and acclimated through serial passages *in vivo* for procuring an adaptive colonization *H. pylori* strain. Then, two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) was taken to separate and identify the global proteins significantly changed between *H. pylori* strain M₀ and the adaptive strain. Through serial passages the infectious rate increased from about 2/10 to 9/10 and a adaptive colonization strain M₁₃ has been obtained. Comparative proteomic technology display that the proteinogram of *H. pylori* have changed after colonization in gerbils. Out of 5 differential protein spots cut out of gels for MALDI-TOF-MS identification, 4 spots were successfully identified, among which, Icd, RfaD and HP0318 were significantly higher in M₁₃ compared with M₀, while only HypB were found in M₁₃. So far, HP0318 is a conserved hypothetical protein. These proteins may be important factors of *H. pylori* for adaptive colonization.

Keywords: *Helicobacter pylori*; adaptive variation; Mongolian gerbils; 2-DE

Foundation item: Chinese National High-Technology Research & Development Program (2003AA2Z3C64); Chinese National Natural Science Foundation (30400019)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-23-68752316; E-mail: qmzou@mail.tmmu.com.cn

Received: 1 September 2006/Accepted: 23 October 2006/Revised: 13 December 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>