

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):661-669; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

炭疽杆菌在家兔盲肠结扎模型内外培养的蛋白表达差异

任静晓^{1,2#}, 植懿丹^{1#}, 刘先凯¹, 朱力¹, 冯尔玲¹, 王华贵¹, 陈福生^{2*}, 王恒樑^{1*}

(¹ 军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

(² 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘要:【目的】建立家兔盲肠结扎模型, 研究炭疽杆菌在家兔体内外不同培养条件下的蛋白表达差异。【方法】本实验通过进行家兔盲肠结扎模型对炭疽杆菌进行体内外培养, 用不同方法提取胞外蛋白、细胞壁蛋白及全菌体蛋白, 并经双向电泳分离和质谱鉴定。【结果】送检 144 个蛋白点, 检出 124 个, 其中包括上清蛋白 19 个, 细胞壁蛋白 29 个, 全菌体蛋白 76 个。【结论】经分析发现, 与合成代谢相关的蛋白在体内主要呈下调趋势, 包括多种氨基酰-tRNA 合成酶、长链脂肪酸 CoA 连接酶等; 在体内表达上调的蛋白则具有多种功能, 其中包括分子伴侣 DnaK、超氧化物歧化酶 SodA、S-层蛋白等。

关键词: 炭疽芽孢杆菌 A16R; 家兔盲肠结扎模型; 双向电泳

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0661-09

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 简称炭疽杆菌, 是好氧性、不能运动的革兰氏阳性菌^[1]。它可感染动物和人引起皮肤炭疽、肺炭疽和肠炭疽等, 其中食草动物发病率最高^[2], 人可通过摄食或接触患炭疽病的动物和畜产品而致病。炭疽病是五大人畜共患病之一, 目前在世界范围内仍存在局部的爆发流行, 对畜牧业及人类健康的危害很大。除此之外, 炭疽杆菌因其芽孢形式稳定性好、易于传播等特点, 被用作首要的生物战剂和制造生物恐怖, 对社会稳定造成很大威胁^[3]。因此炭疽杆菌对人类社会的影响是极其巨大的, 这使得与之相关的研究一直是生命科学领域的热点之一。

细菌在宿主环境中能够发挥毒性作用的前提是必须首先能够在宿主体内存活, 适应环境的变化, 有效利用能源, 抵抗各种抗菌物质的攻击。因此, 在宿主体内表达上调的蛋白可能与细菌的毒力发挥过程相关。但由于条件的限制, 要在完全接近炭疽杆菌

的致病状态下收集足量的蛋白样品用于蛋白质组学的研究仍存在不少困难, 目前报道的与炭疽杆菌在宿主体内变化有关的蛋白质组研究数据都是通过体外模拟得到的。模拟方案是在含 NaHCO₃ 的培养基中、置于高 CO₂ 环境下 37℃ 培养^[4-7]。这种体外模拟缺少宿主的动态参与, 所得信息与真实的感染过程仍有一定的差别。因此, 本研究通过家兔盲肠结扎模型对炭疽杆菌进行体内培养。通过对比该状态下与体外培养的蛋白表达差异, 以此来筛选可能与炭疽杆菌的毒力发挥相关的蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物: 我国人用炭疽杆菌活疫苗 A16R (pXO1⁺, pXO2⁻), 本实验室保存; 家兔用清洁级日本大耳白兔, 雌性, 约 3 kg, 购自军事医学科学院动物中心。

基金项目: 国家自然科学基金 (30670104)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948836; E-mail: Chenfs@mail.hzau.edu.cn; wanghl@nic.bmi.ac.cn

作者简介: #并列第一作者。任静晓 (1986-), 女, 河南省洛阳市, 硕士研究生, 从事食品营养与安全方面的研究, E-mail: jingxiao-860207@163.com; 植懿丹 (1981-), 女, 广西, 硕士研究生, 从事微生物功能基因组学研究

收稿日期: 2009-10-30; **修回日期:** 2009-12-31

1.1.2 主要试剂和仪器:变溶菌素(Mutanolysin, 购自 Sigma); IPG 干胶条、蛋白定量试剂盒(2-D Quant Kit)、蛋白纯化试剂盒(2-D Clean up Kit) 购自 GE Healthcare; 蛋白酶抑制剂(Roche); Ettan™ IPGphor™ 水平等电聚焦仪(GE Healthcare); Protean II Xi 垂直板 SDS-PAGE 电泳仪(Bio-Rad); ImageScanner 扫描仪(Amersham pharmacia); 真空离心浓缩仪(CHAIST); REFLEXTM III 型 MALDI-TOF 质谱仪(Bruker)。

1.2 家兔盲肠结扎模型的建立

活化 A16R(pXO1⁺, pXO2⁻) 单菌落, 传代两次, 然后按 1% 接种于 2 瓶 100 mL LB 培养液, 37℃、225 r/min 培养, 到对数生长中期时收集 150 mL 菌液, 用冰浴的低盐 PBS 溶液清洗菌体 4 次后, 重悬于 40 mL PBS 溶液中。取 20 mL 装于长约 20 cm 的透析袋内, 通过无菌操作将透析袋放置于大耳白兔回肠末端, 将切口缝合并部分结扎肠道使透析袋不位移且保持肠道通畅, 培养 8 h。剩余 20 mL 菌液同步在 37℃ 培养箱内静止培养, 培养结束后从家兔腹腔内取出透析袋, 吸出菌液作为体内培养的样品, 与体外样品一起进行各种蛋白样品的制备。

1.3 蛋白样品制备

1.3.1 胞外蛋白样品的制备:经家兔盲肠体内外培养后, 4℃ 离心收集培养上清(沉淀用于制备全菌体和细胞壁蛋白样品), 0.22 μm 滤膜过滤后, 用 15% 三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白, 离心收集后用 90% 丙酮洗涤后加入纯化试剂盒的洗液, 冻存于 -20℃ 备用^[8]。

1.3.2 全菌体蛋白样品的制备:菌体与培养上清分离后, 用预冷的低盐 PBS 重悬洗涤 4 次。最后一次洗涤前分出大部分悬液用于细胞壁蛋白样品制备。最后一次重悬定容于 1 mL 裂解液(7 mol/L 尿素/2 mol/L 硫脲/4% CHAPS/1% DTT/蛋白酶抑制剂)。冰浴超声 10 min, 然后分别加入 10 μL DNase、RNase 和 pH 3-10 IPG 缓冲液, 室温静置 1 h, 40000 × g 15℃ 离心 20 min 去除不溶沉淀。经定量后每 800 μg 上样量分装, -80℃ 保存备用。

1.3.3 细胞壁蛋白样品的制备:用纯水洗涤用于制备细胞壁蛋白样品的悬液, 加入 1.5 mL 缓冲液[1.5 mmol/L TriS-HCl (pH 7.5)、3 mmol/L MgCl₂、25% 蔗糖]重悬, 再加入 75 μL 125 U/mL 的变溶菌素, 37℃ 温育 2 h 后, 4℃ 12000 × g 离心 15 min 收集上清。上清过滤除菌后用 15% 的 TCA 沉淀蛋白, 然后离心收集蛋白, 经定量后按每管 400 μg 分装,

-80℃ 冻存备用^[9]。

1.4 双向电泳

IPGphor 第一向等电聚焦电泳主要是依据产品操作手册进行, 并参照 Görg A 等^[10] 描述的方法进行一些改进。取 800 μg 样品, 加入 1.75 μL IPG 缓冲液, 后加水化液(7 mol/L 尿素/2 mol/L 硫脲/1% DTT/4% CHAPS/痕量溴酚蓝)至总体积为 350 μL。等电聚焦程序是: 20℃ 水化 2 h, 30V 水化 10 h; 梯度电压 300 V、600 V、1000 V、8000 V 各 1 h, 然后 8000 V 恒定电压聚焦到所需电压时间积。第一向电泳后胶条分别在含有 0.1 g DTT 和 0.25 g 碘乙酰胺的平衡缓冲液(50 mmol/L pH 8.8 的 TriS-HCl, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 痕量溴酚蓝)中平衡 15 min, 然后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 胶内酶切和质谱鉴定

胶内酶切的方法参见文献^[11]。质谱检测由国家生物医学分析中心来完成。点靶: 将 α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-CCA)溶于含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈溶液中, 制成饱和溶液, 离心, 取 1 μL 上清与 1 μL 肽段提取液等体积混合, 取 1 μL 点在 Score384 靶上, 送入离子源中进行检测。检测: 反射检测方式; 飞行管长 3 m; 氮激光器: 波长 337 nm; 加速电压 20 kV; 反射电压为 23 kV。

1.6 数据库查询

在国家生物医学分析中心使用炭疽杆菌基因组本地运行 Mascot 检索(包含炭疽杆菌 Ames、Ames0581 和 2012 株及两个大质粒的相关信息), 并通过 Mascot(<http://www.matrixscience.com>) 在相应的革兰氏阳性菌数据库中进行肽质量指纹谱检索。检索参数选择如下: 氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl(C) 修饰、可能修饰方式选择 Oxidation(M) 修饰; 可接受的肽段分子量误差为 0.3 Da(可适当调整)。最后将肽质量指纹图谱数据通过浏览对应的文本文件或复制全部数值递交给 Mascot 数据框进行检索。为使鉴定结果更可靠, 每一个查询要求至少有 5 个肽段匹配, 且其在蛋白质整个蛋白质序列中的覆盖率不低于 15%; 对小于 20 kDa 的蛋白质, 则要求至少有 3 个肽段匹配和不低于 20% 的覆盖率。

2 结果

2.1 炭疽杆菌 A16R 在家兔盲肠体内外培养各种蛋白样品的双向电泳图比较

2.1.1 胞外蛋白样品双向电泳胶图的比较及差异

点: 根据样品提取方法得到约 100 μg 胞外蛋白, 经双向电泳分离后得到相应电泳胶图(图 1)。不同培

养条件下得到的样品差异比较大, 其中家兔盲肠体内与体外样品相比, 上调 16 个, 下调 12 个。

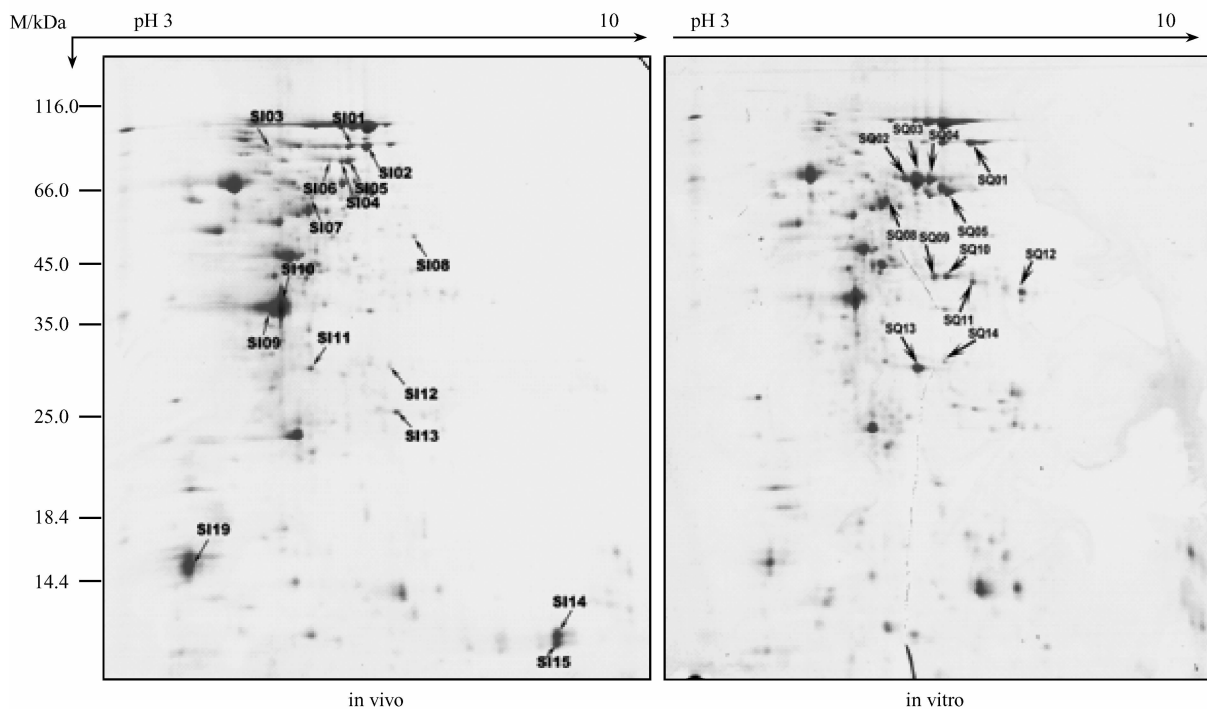


图 1 炭疽杆菌在家兔盲肠体内外培养胞外蛋白双向电泳图及主要差异点

Fig. 1 Different protein spots of *Bacillus anthracis* extracellular protein from in vivo and in vitro sample.

2.1.2 细胞壁蛋白样品双向电泳胶图及其差异点: 以 400 μg 上样所得到的双向电泳胶图如图 2。从图中可以看出, 样品分离的效果较好, 蛋白点较圆整,

边界较清晰。两样品的差异点比例较大, 同一批次样品的重复性较好, 但是不同的动物实验样品重复性不是很好, 其中只有小部份的差异点重复性较好。

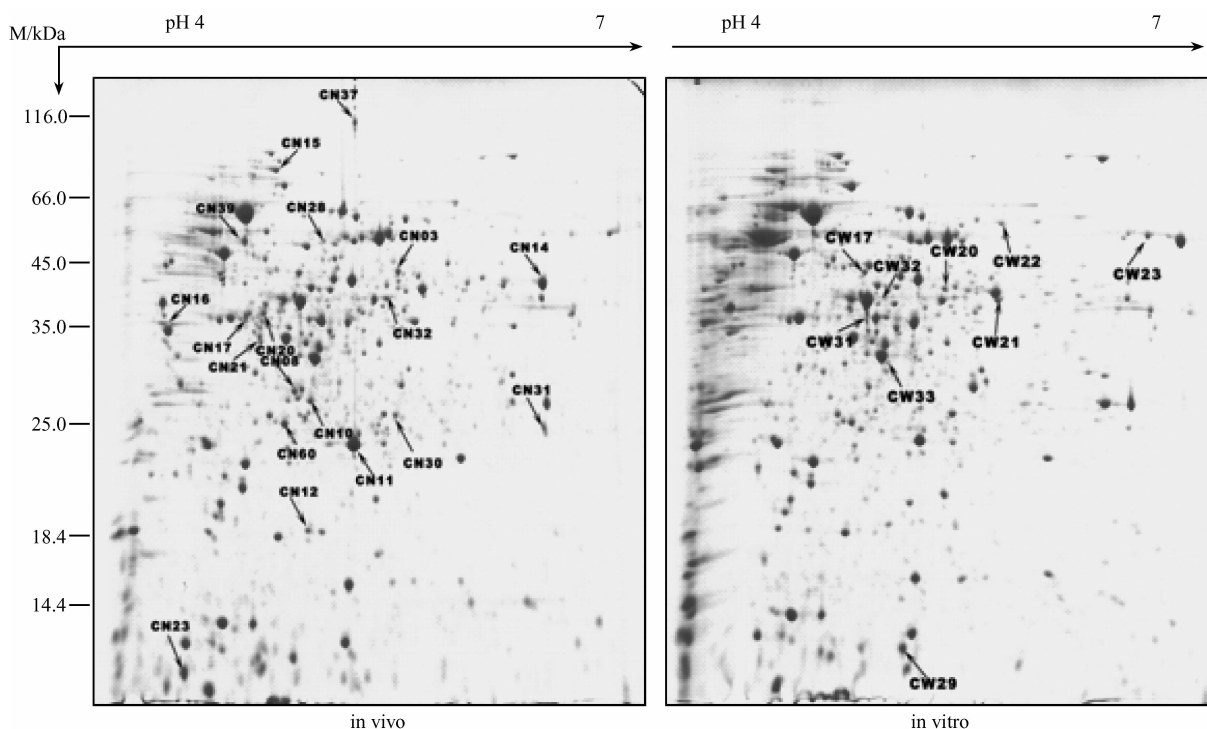


图 2 炭疽杆菌在家兔体内外培养细胞壁样品双向电泳胶图及主要差异点

Fig. 2 Different protein spots of *Bacillus anthracis* cell wall protein from in vivo and in vitro sample.

对两次实验均稳定出现的差异点进行了标注,其中体内与体外样品相比,上调点 20 个,下调点 9 个。

2.1.3 全菌体蛋白样品双向电泳图及差异点:全菌体蛋白样品进行了 pH 4-7、pH 4.5-5.5、pH 6-11 三种梯度的双向电泳图(图 3)。由于 pH 4-7

范围内的蛋白点相对较密集,尤其是 pH 4.5-5.5 之间,因此在进行差异点分析时,对于窄梯度范围内的蛋白点以 pH 4.5-5.5 胶图为参考,其余部分以 pH 4-7 胶图为依据。在 pH 6-11 双向胶图中,对于碱性分子量较小的蛋白分离效果不算理想,且该区域尚未发现稳定出现的差异点。

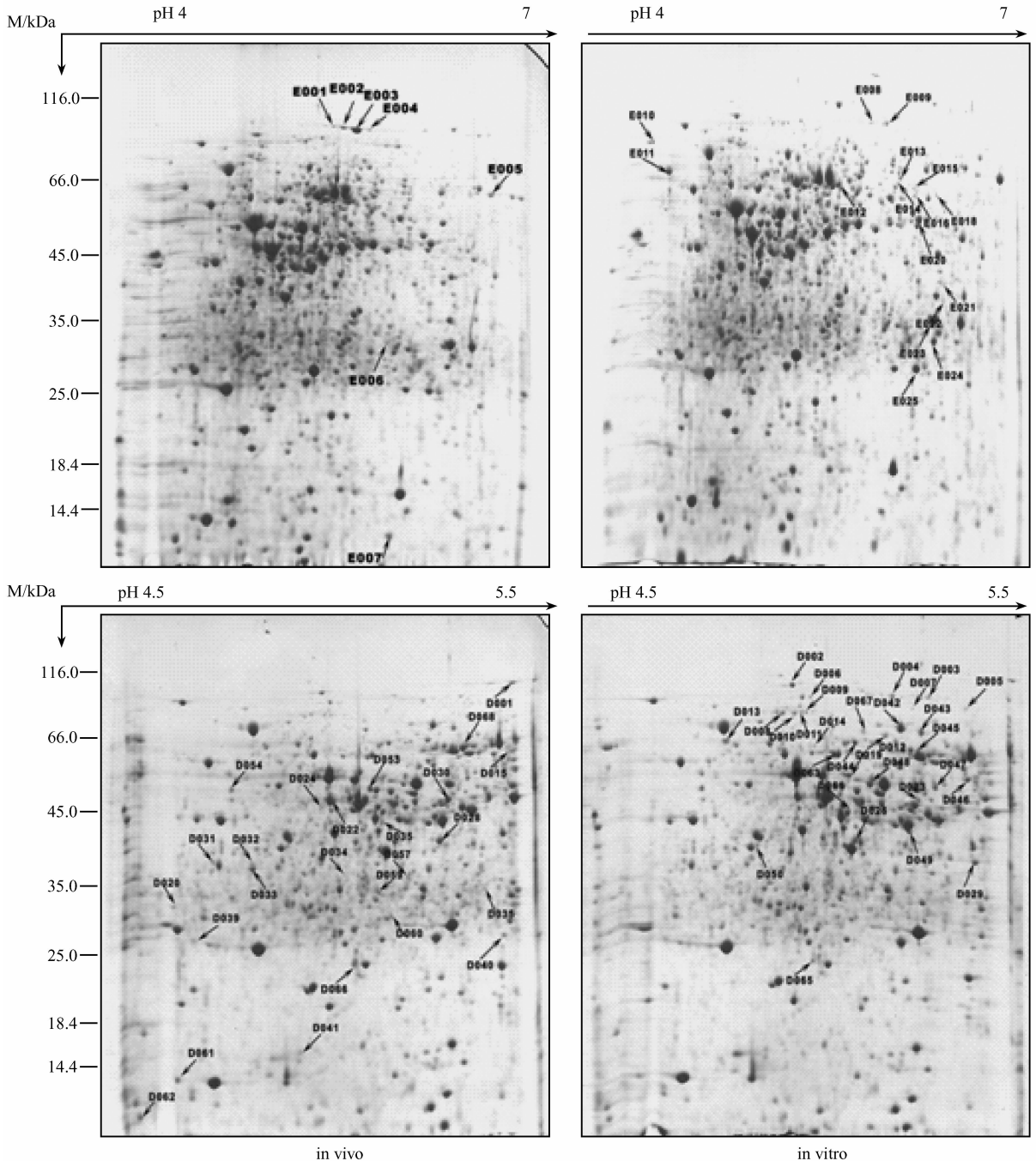


图 3 炭疽杆菌在家兔体内外培养的全菌体蛋白样品双向电泳胶图及主要差异点

Fig. 3 Different protein spots of *Bacillus anthracis* whole cellular protein from in vivo and in vitro sample.

2.2 差异点质谱鉴定结果

在国家生物医学分析中心使用炭疽杆菌基因组本地运行 Mascot 检索(包含炭疽杆菌 Ames、

Ames0581 和 2012 株及两个大质粒的相关信息),并通过 Mascot(<http://www.matrixscience.com>)在相应的草兰氏阳性菌数据库中进行肽质量指纹谱检

索, 得到的检索结果及相应信息如表 1-6。

表 1 胞外上调蛋白点质谱检索结果

Table 1 Database searching results of extracellular protein spots up-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function
SI02	sap	121	30254634	BA0885	29	8	S-layer protein Sap
SI04*	ALB	124	44889024		26	12	Serum albumin precursor
SI05*	ALB	261	44889024		50	24	Serum albumin precursor
SI06*	ALB	97	44889024		23	11	Serum albumin precursor
SI07	-	73	30258823	BA4322	24	7	5'-nucleotidase family protein
SI08	-	65	47502254	GBAA-Chrom-1853	25	7	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, family 4
SI09	-	98	30257881	BA3338	38	7	S-layer protein, putative
SI10	-	94	30257881	BA3338	40	7	S-layer protein, putative
SI14*	HBB1	93	122676		72	7	Hemoglobin subunit beta-1/2

Note: Asterisk stands for the proteins which are not belong to the Bacillus anthracis detecting in the NCBI database.

表 2 胞外下调蛋白点质谱检索结果

Table 2 Database searching results of extracellular protein spots down-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function
SQ02	-	88	30258170	BA3645	24	7	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein, putative
SQ03	-	102	30258170	BA3645	38	9	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein, putative
SQ04	-	78	30258170	BA3645	24	8	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein, putative
SQ05	-	126	30256692	BA2041	35	10	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein, putative
SQ08	-	122	30253849	BA0309	40	8	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
SQ10	-	150	30253869	BA0331	38	7	polysaccharide deacetylase-like protein
SQ11	-	216	30253868	BA0330	54	14	polysaccharide deacetylase-like protein
SQ14	-	121	30259391	BA4893	53	8	conserved hypothetical protein

表 3 细胞壁上调蛋白点质谱检索结果

Table 3 Database searching results of cell wall protein spots up-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function	Location
CN03	-	151	30258743	BA4240	38	12	acetyl-CoA acetyltransferase	Cytoplasmic
CN08	tsf	71	30258474	BA3964	29	8	translation elongation factor Ts	Cytoplasmic
CN09	tsf	59	30258474	BA3964	42	11	translation elongation factor Ts	Cytoplasmic
CN10	tsf	82	30258474	BA3964	36	11	translation elongation factor Ts	Cytoplasmic
CN11	sod-1	78	30259005	BA4499	59	7	superoxide dismutase, Mn	Extracellular
CN12	-	108	30260021	BA5563	78	11	PTS system, glucose-specific IIA component, putative	Cytoplasmic
CN14	guaB	147	30253523	BA0008	45	18	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Unknown
CN16	dnaK	133	30259043	BA4539	34	20	chaperone protein dnaK	Cytoplasmic
CN17	-	137	30256909	BA2267	64	22	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Cytoplasmic
CN18	-	140	30256909	BA2267	63	21	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Cytoplasmic
CN20	-	142	30256909	BA2267	58	17	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Cytoplasmic
CN21	bfbAb	143	30258881	BA4383	63	19	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase, beta subunit	Unknown
CN30	fusA	57	30253619	BA0107	60	16	translation elongation factor G	Cytoplasmic
CN39	fusA	189	30253619	BA0107	40	29	translation elongation factor G	Cytoplasmic
CN60	-	150	30265163	BA1211	73	18	triosephosphate isomerase	Unknown
CN28	pdhD	140	30258686	BA4181	44	17	pyruvate dehydrogenase complex E3 component, dihydroliipoamide dehydrogenase	Cytoplasmic
CN32	gap-2	76	30259842	BA5369	30	8	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasmic
CN31	-	82	30259248	BA4761	53	11	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	Unknown

表 4 细胞壁下调蛋白点质谱检索结果

Table 4 Database searching results of cell wall protein spots down-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function	Location
CW17	ampS	165	30253867	BA0329	56	22	aminopeptidase AmpS	Unknown
CW21	dhaS	89	30258137	BA3609	43	19	aldehyde dehydrogenase	Cytoplasmic
CW22	-	196	30254654	BA0908	55	32	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein	Cellwall
CW23	guaB	276	30253523	BA0008	68	33	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Unknown
CW29	-	125	30259683	BA5200	39	19	transcriptional activator tipA, putative	Unknown
CW31	-	69	30256909	BA2267	43	13	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Cytoplasmic
CW32	pepQ-2	229	30259360	BA4861	79	26	proline dipeptidase	Cytoplasmic
CW33	-	146	47506071	BA1795	55	17	methionine aminopeptidase, type I	Cytoplasmic Membrane

表 5 全菌体上调蛋白点质谱检索结果

Table 5 Database searching results of whole cellular protein spots up-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function
E001	eag	231	30254635	BA0887	40	27	S-layer protein EA1
E003	eag	285	30254635	BA0887	58	34	S-layer protein EA1
E004	eag	240	30254635	BA0887	52	31	S-layer protein EA1
E006	-	69	30255272	BA1330	48	8	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase, putative
D020	-	105	30259438	BA4943	57	12	tRNA binding domain protein, putative
D022	-	122	30256909	BA2267	57	18	alcohol dehydrogenase, zinc-containing
D024	tkt-2	73	30258263	BA3744	38	20	transketolase
D031	-	114	30257071	BA4221	54	18	conserved hypothetical protein
D033	tuf	84	30253620	BA0108	49	15	translation elongation factor Tu
D054	tuf	79	30253620	BA0108	48	15	translation elongation factor Tu
D041	-	61	30259858	BA5385	44	8	mutT/nudix family protein
D053	rpsA	196	30255447	BA1519	67	17	ribosomal protein S1
D057	-	93	30257014	BA2378	63	16	conserved hypothetical protein
D059	acnA	80	30258198	BA3677	18	15	aconitate hydratase I
D061	rplL	82	30253612	BA0100	48	8	ribosomal protein L7/L12
D068	mmsA-1	132	30256990	BA2354	48	20	methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase

表 6 全菌体下调蛋白点质谱检索结果

Table 6 Database searching results of whole cellular protein spots down-regulated

Spot	Gene	Score	GI	Ames	Seq-cov/%	Mat-num	Protein function
D002	fusA	289	30253619	BA0107	56	35	translation elongation factor G
D005	thrS-2	98	30259321	BA4820	28	17	threonyl-tRNA synthetase
D006	proS-2	82	30258467	BA3957	34	17	prolyl-tRNA synthetase
D007	-	55	30257176	BA2553	25	14	acetoacetyl-CoA synthase, putative
D008	pepF-1	133	30255158	BA1206	43	26	oligoendopeptidase F
E017	-	104	30260153	BA5706	38	18	oligoendopeptidase F
D009	glmS	232	30253669	BA0159	54	31	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing)
D010	glmS	219	30253669	BA0159	53	30	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing)
D011	aspS-2	143	30259130	BA4623	37	21	aspartyl-tRNA synthetase
D012	-	180	30254821	BA1091	65	28	long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative
D013	pepA	99	30259641	BA5155	39	17	cytosol aminopeptidase
D014	trzA	91	47502304	GABB-Chrom-1903	44	17	chlorohydrolase family protein
D016	ald-2	161	30259372	BA4873	78	24	alanine dehydrogenase
D017	nagA	109	30258776	BA4274	50	18	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
D018	hemL-1	59	30254057	BA0531	48	11	glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase
D019	prfA	98	30260030	BA5572	49	16	peptide chain release factor 1
D021	pepQ-1	102	30258918	BA4422	60	14	proline dipeptidase
D023	-	117	30253592	BA0079	66	20	phosphotransferase domain protein
D029	gtaB	187	30259638	BA5152	66	22	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
D037	-	89	30258518	BA4009	53	10	guanylate kinase, putative
D042	hutU	176	30258232	BA3711	50	27	urocanate hydratase
E010	hutU	128	30258232	BA3711	42	21	urocanate hydratase
D043	pckA	108	30259511	BA5019	38	19	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
D044	gatB	208	30253860	BA0322	58	31	glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase, B subunit
D046	hmp	140	30255399	BA1467	52	21	flavohepotein
D047	-	91	30254645	BA0897	39	13	Peptidase, family M20/M25/M40 protein
D048	pgk	160	30259841	BA0567	72	24	phosphoglycerate kinase

3 讨论

3.1 三种蛋白样品的提取和分离鉴定情况

一次动物实验所得胞外蛋白样品的总量不高,仅够一次双向电泳。分离的蛋白总数并不多,但是有不少蛋白点差异明显,且重复性好(所标注的为2次动物实验中均出现的差异点)。从质谱鉴定结果中可以看到有几个非炭疽杆菌的蛋白(如 Table-1 所示),造成这种现象的原因是由于装有菌体的透析袋在家兔盲肠内培养时,与宿主体内环境进行相关动态交换所造成的。

细胞壁蛋白样品的制备是利用变溶菌素提取的。通过变溶菌素破坏细胞壁的肽聚糖骨架,使细胞壁上的蛋白释放出来。变溶菌素在研究中被用于链球菌细胞壁蛋白的提取^[12],但在炭疽杆菌中的应用尚未见报道。实验中通过镜检观察到变溶菌素作用完成后炭疽杆菌形态完好(结果未列出),提示样品制备过程中不存在严重的菌体破裂而造成的胞质蛋白污染情况。从细胞壁和全菌体蛋白样品双向电泳胶图的比较中可以看到两者存在明显差异,该方法用于细胞壁的提取是可行的。

3.2 家兔盲肠结扎模型内外培养蛋白变化的基本特点

本实验中鉴定到的差异蛋白种类较多,与能量代谢、应激反应、物质转运、结构、转录等相关。这些蛋白变化复杂,体现了生物体在生长环境的改变中所做的精细调节。

(1) 合成代谢相关的蛋白

在3种蛋白样品中均鉴定到了与生长代谢相关的蛋白,尤其在全菌体蛋白。在家兔体内培养条件下,这类蛋白呈下调趋势。例如,在蛋白质合成中涉及到的多种氨基酰-tRNA合成酶下调,包括苏氨酰-tRNA合成酶(D005)、脯氨酰-tRNA合成酶(D006)、天冬氨酰-tRNA合成酶(D011)等表达下调,同时还检测到肽链释放因子1(D019)的下调。在脂类合成中,观察到了长链脂肪酸CoA连接酶(D012)的下调,反映了在体内环境中脂类合成是下调的。但糖代谢相关的蛋白变化比较复杂,没有如此一致的变化趋势。

(2) 翻译延伸因子的变化

本实验观察到几种延伸因子Tu、Ts和G因子的变化趋势并不一样,表现出相当的复杂性。例如全菌体蛋白样品中的G因子(D002)是下调的,而细胞壁蛋白样品中的G因子(CN30)是上调的,这可

能与不同环境中细菌对翻译延伸因子的使用偏好有关,是否影响最终蛋白表达的结果并不清楚。

(3) 应激蛋白在体内表达上调

细菌在应激条件下能做出一系列的反应,从而引起相关蛋白的变化。本实验观察到的分子伴侣DnaK(CN16)在体内环境中明显上调。这种反应与观察到的与蛋白合成相关的蛋白酶下调的变化一样,均反映了细菌面临宿主环境时所做的一系列适应性变化。此外还观察到了超氧化物歧化酶(CN11)的变化。炭疽杆菌抵抗宿主氧化杀伤的能力比较强,可以使其在巨噬细胞中逃避宿主的氧化杀伤^[13]。超氧化物歧化酶是在氧化应激时上调的蛋白,在本实验中该酶在细胞壁样品中可见表达上调,但在全菌体样品中并未观察到这种变化。这可能与这个蛋白在细胞中的定位有关。

(4) 物质转运系统的变化

鉴定到的与细菌物质转运相关的蛋白,大部分呈下调趋势,如寡肽ABC转运子(SQ03、SQ04)等,这可能体现了在应激状态中细菌与外界的物质交换减慢,以此来减少杀菌物质的攻击。但在细胞壁样品中分离到一差异蛋白为PTS系统中葡萄糖特异的IIA组分(CN12),其表达是上调的。PTS系统即磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统,是细菌进化过程中形成的精细复杂的多蛋白糖转运及磷酸化系统^[14-15]。PTS系统中葡萄糖特异的IIA组分的上调提示了细菌在宿主环境中物质交换减慢的情况下,对某些能量转运系统成分的表达上调以满足自身生长代谢的需要。

(5) S-层蛋白表达上调

一个令我们很感兴趣的是:在本试验中发现了3个S-层蛋白的表达上调。分别为在家兔体内培养的细菌全菌体蛋白样品中的EA1蛋白(E003)和胞外蛋白中的Sap蛋白(SI02)和S-层假想蛋白BA3338(SI10)。这3个蛋白在家兔盲肠体内培养都显著的上调,这与一些文献报道的S-层蛋白可能是一种毒力因子相吻合。

S-层即表面层(surface layer),是广泛存在于真细菌和古细菌细胞壁表面的一种晶体结构,构成该结构的蛋白是细胞中含量最丰富的蛋白之一,具有独特的结构和功能^[16]。相关研究表明,S-层具有保护细胞、连接细胞外酶类、分子筛和细胞黏附等作用^[17],在病原体中,S-层还可抵抗宿主的免疫攻击,很可能是一种毒力因子^[18]。

炭疽杆菌的表面比较复杂:S-层位于细胞壁肽

聚糖层与荚膜之间^[19],除此之外,与其他多数细菌由单一蛋白组成 S-层不同,炭疽杆菌的 S-层主要由胞外抗原 1 (extracellular antigen 1, EA1) 和表面排列蛋白 (surface array protein, Sap) 组成,当前对于炭疽杆菌 S-层蛋白的了解几乎都是通过对 Sap 和 EA1 这两个主要的 S-层蛋白的研究得出的。早期研究^[20, 21]认为,EA1 是主要组成 S-层晶格结构的蛋白,而 Sap 则是掺入其中,对晶格的形成起辅助作用;并且细菌的 S-层组成与生长时相相关,对数生长期 S-层由 Sap 组成,到稳定期则换成 EA1。本实验中所观察到 Sap 和 EA1 同时出现在细胞表面的现象仅仅出现在转变过程中的很短的一段时间。不过在模拟体内生长过程的研究中发现,EA1 是主要的 S-层蛋白,Sap 含量很少,并没有观察到体外培养时两蛋白明显的时相表达特点^[21]。体内环境中,毒力调控因子 AtxA 受温度及高浓度的 CO₂ 激活,影响下游的 PagR 的表达,并通过 PagR 调控 S-层蛋白的表达,抑制 Sap 而上调 EA1^[21]。在 sap 缺失突变株的培养基里,保护性抗原 (PA) 及致死因子 (LF) 含量上升,提示了 Sap 对于毒素的最大量释放是不利的。而 pXO1 上调毒力蛋白的基因可激活 eag 的转录,则暗示了 EA1 在与宿主的相互作用中可能扮演着某种角色。这一研究表明 S-层蛋白与炭疽杆菌的毒力调控网络有关,但具体的作用至今未见文献报道。

根据炭疽杆菌的基因组注释发现,在炭疽杆菌的染色体上除了 EA1 和 Sap 两个主要的 S-层蛋白以外,在染色体上还存在着 12 种可能的假想的 S-层蛋白基因,这些基因是否能够表达,在什么时间表达,以及其表达后所起的作用等都尚不清楚,均有待于研究。本研究中在家兔体内培养上清蛋白样品中观察到一假想的 S-层蛋白基因 (BA3338),该基因编码的假想 S-层蛋白显著上调,这一方面验证该蛋白在炭疽杆菌体内确实是表达的,同时预示着这个 S-层蛋白可能与炭疽杆菌的毒力有关。

除此之外,在鉴定结果中有 12 个蛋白点均为甲酸乙酰转移酶,其变化上调、下调均有。该酶是厌氧条件下糖代谢途径中的关键酶,可以将丙酮酸和 CoA 转化为乙酰 CoA 和甲酸,它的复杂变化提示了多种修饰的存在,这些修饰的意义尚不明了。

通过比较家兔盲肠结扎模型内外培养炭疽杆菌的胞外蛋白、细胞壁蛋白及全菌体蛋白的表达差异,可以看出菌体进入宿主体内后首先面临的是一个生存环境的改变,因而炭疽杆菌体内一些相应的应激蛋

白表达上调,与体内一些合成代谢相关的蛋白暂时下调,同时为了对抗宿主体内的各种杀菌物质或逃避宿主的免疫系统的免疫损伤作用或增强侵袭性,上调菌体上可能的毒力因子,如 S-层蛋白。通过这些研究我们可以看出,细菌与宿主作用后的反应是复杂的,如果没有后续的功能研究和验证,仅凭这些数据,不足以解释说明各种假设的真实存在,故要从中筛选蛋白进行后续的功能研究。尤其是对实验中可能的毒力因子 S-层蛋白进行深入的研究,对于认识炭疽毒力作用及以后的疫苗开发都具有重要的意义。

参考文献

- [1] Julia YW, Michael H. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus and toxin. *Medical Immunology*, 2005, 4 (4):1-8.
- [2] Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Review Microbiol*, 2001, 55:647-671.
- [3] Inglesby TV, O'Toole T, Friedlander AM, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *The Journal of the American Medical Association*, 2002, 287(17):2236-52.
- [4] Ristroph JD, Ivins BE. Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new defined culture medium. *Infection and Immunity*, 1983, 39(1):483-486.
- [5] Bartkus JM, Leppla SH. Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*, 1989, 57(8):2295-2300.
- [6] Cataldi A, Fouet A, Mock M. Regulation of pag gene expression in *Bacillus anthracis*: use of a pag-lacZ transcriptional fusion. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 99(1):89-93.
- [7] Sirard JC, Mock M, Fouet A. The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(16):5188-5192.
- [8] Ying TY, Wang HL, Li MZ, et al. Immunoproteomics of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Shigella flexneri* 2a 2457T. *Proteomics*, 2005, 5:4777-4793.
- [9] Winterhoff N, Goethe R, et al. Identification and Characterization of Two Temperature-Induced Surface-Associated Proteins of *Streptococcus suis* with High Homologies to Members of the Arginine Deiminase System of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(24):6768-6776.
- [10] Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2005, 5(3):826-827.

- [11] Liao X, Ying TY, Wang HL, et al. A modified method of in-gel digestion of Coomassie brilliant-blue stained 2-D gels. *Letters In Biotechnology*, 2003, 14(6):509-511.
- [12] Liu TJ, Xu WL, Zhang YZ. History and prospects of the research on mutanolysin. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(2): 224-227.
- [13] Raines KW, Kang TJ. Importance of Nitric Oxide Synthase in the Control of Infection by *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*, 2006, 74(4): 2268-2276.
- [14] Meadow ND, Fox DK, Roseman S. The bacterial phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59:497-542.
- [15] Postma PW, Lengeler JW, Jacobson G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *FEMS Micrology Reviews*, 1993, 57(3): 543-594.
- [16] Sleytr UB. Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly and function. *International Review of Cytology*, 1978, 53: 1-64.
- [17] Beveridge TJ, Pouwels PH, Sára M, et al. Functions of S-layers. *FEMS Micrology Reviews*, 1997, 20(1): 99-149.
- [18] Pei Z, Blaser MJ. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 1990, 85(4):1036-1043
- [19] Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P. et al. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(1): 52-58.
- [20] Mesnage S, Tosi-Couture E, Mock M. et al. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(6): 1147-1155.
- [21] Mignot T, Mock M, Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(4):917-927.

Differential expression proteins of *Bacillus anthracis* cultured in rabbit's intestinal tract model

Jingxiao Ren^{1,2#}, Yidan Zhi^{1#}, Xiankai Liu¹, Li Zhu¹, Erling Feng¹, Huagui Wang¹, Fusheng Chen^{1*}, Hengliang Wang^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

(² College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] The rabbit's intestinal tract model was constructed to analyze the different expression proteins of *Bacillus anthracis* in vitro and in vivo. [Methods] We used the rabbit's intestinal tract model to culture the *Bacillus anthracis*, using different methods to extract the extracellular proteins, cell wall proteins and whole cellular proteins from the in vivo and in vitro samples. Those proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by mass spectrum. [Results] We had been distinguished about 144 differential expression protein spots between in vivo and in vitro samples, and 124 spots were identified, including 19 supernatant proteins, 29 cell wall proteins and 78 whole cellular proteins. [Conclusion] Those proteins which related to the anabolic metabolism were down-regulated in vivo, including threonyl-tRNA synthetase, prolyl-tRNA synthetase, long-chain-fatty-acid-CoA ligase. There were also many up-regulated proteins in vivo, such as DnaK, SodA and S-layer proteins.

Keywords: *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R; the rabbit's intestinal tract model; two-dimensional gel electrophoresis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670104)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-66948835; wanghl@nic.bmi.ac.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 30 October 2009/Revised: 31 December 2009